

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Václav Koucký**

## **Detekce časných patofyziologických změn dýchání u dětí s chronickým plicním onemocněním**

Detection of early pathophysiological changes of breathing in children with  
chronic respiratory disease

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Petr Pohunek, CSc.

Konzultant: MUDr. Jiří Uhlík, PhD.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.01.2020

MUDr. VÁCLAV KOUCKÝ

Podpis:

**Identifikační záznam:**

KOUCKÝ, Václav. *Detekce časných patofyziologických změn dýchání u dětí s chronickým plicním onemocněním. [Detection of early pathophysiological changes of breathing in children with chronic respiratory disease]*. Praha, 2020. 132s, 0 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Pediatrická klinika 2. LF UK a FN Motol. Vedoucí práce prof. MUDr. Petr Pohunek, CSc.

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli a konzultantovi za metodické vedení dizertační práce a podporu během postgraduálního studia. Dále bych chtěl poděkovat kolegyním a kolegům z Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol za pomoc při sběru klinických dat. Zvláštní poděkování patří MUDr. Janu Šulcovi, CSc., který mě naučil metodiku funkčního vyšetření nespolupracujících dětí a předal řadu cenných zkušeností nejenom v oboru plicní funkční diagnostiky. Neméně významné poděkování patří mému otci, doc. RNDr. Miroslavu Kouckému, CSc., za soustavnou podporu při studiu a také významnou pomoc při zpracování naměřených dat. Dále mu patří poděkování za spolunavržení a naprogramování software pro hodnocení ventilační odpovědi kojenců na hyperoxii. Děkuji též rodičům pacientů za souhlas s účastí jejich dětí v předkládaných studiích.

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod .....   | 1  |
| 2. Patofyziologické změny dýchání u dětí s chronickým respiračním onemocněním ..... | 3  |
| 2.1. Změny na subcelulární úrovni .....   | 4  |
| 2.2. Změny na úrovni buněk a tkání .....  | 8  |
| 2.3. Změny na úrovni orgánů a celého organismu .....                                | 10 |
| 2.3.1. Funkční změny .....  | 11 |
| 2.3.2. Strukturální změny .....   | 13 |
| 3. Nástroje detekce časných patofyziologických změn dýchacího traktu .....          | 15 |
| 3.1. Molekulárně-genetická analýza .....  | 15 |
| 3.2. Detekce funkčních změn dýchacího traktu .....                                  | 15 |
| 3.2.1. Vyšetření ventilace .....  | 16 |
| 3.2.2. Vyšetření respirace .....  | 29 |
| 3.3. Detekce strukturálních změn dýchacího traktu .....                             | 30 |
| 3.3.1 Mikroskopické změny .....   | 30 |
| 3.3.2. Makroskopické změny .....  | 32 |
| 3.4. Shrnutí teoretické části práce .....   | 34 |
| 4. Cíle práce a hypotézy .....  | 36 |
| 4.1. Pracovní hypotézy .....  | 36 |
| 4.2. Design studie .....  | 38 |
| 5. Metodika práce .....   | 39 |
| 5.1. Pacienti .....   | 39 |
| 5.2. Vyšetření .....  | 44 |
| 5.2.1. Anamnestické údaje .....   | 44 |
| 5.2.2. Antropometrická měření .....   | 46 |
| 5.2.3. Vyšetření funkce plic .....  | 46 |
| 5.2.4. Analýza ventilační odpovědi na hyperoxii .....                               | 51 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.2.5. Hodnocení strukturálních změn sliznice dýchacích cest.....                      | 53  |
| 5.3. Statistická analýza .....   | 55  |
| 6. Výsledky.....   | 57  |
| 6.1. Bezpečnost a proveditelnost iPFT .....  | 57  |
| 6.2. Vzájemný vztah mezi vybranými parametry funkce plic.....                          | 59  |
| 6.3. Porucha funkce plic u jednotlivých skupin pacientů a její klinická relevance..... | 63  |
| 6.4. Ventilační odpověď na hyperoxii.....  | 71  |
| 6.5. Morfologické změny sliznice dýchacích cest.....                                   | 76  |
| 7. Diskuze.....  | 78  |
| 7.1. Bezpečnost a proveditelnost vyšetření .....                                       | 79  |
| 7.2. Vzájemný vztah mezi vybranými parametry funkce plic.....                          | 81  |
| 7.3. Klinický význam parametrů iPFT .....  | 87  |
| 7.4. Ventilační odpověď na hyperoxii.....  | 95  |
| 7.5. Remodelace sliznice dýchacích cest a její vztah k funkci plic.....                | 97  |
| 7.6. Shrnutí praktické části práce .....   | 99  |
| 8. Závěr.....  | 101 |
| 9. Souhrn .....  | 102 |
| 10. Literatura .....   | 106 |
| 11. Seznam zkratk .....  | 126 |
| 12. Seznam publikací autora .....  | 132 |

## 1. Úvod

Chronická plicní onemocnění dětského věku představují heterogenní skupinu chorob, které významným způsobem ovlivňují kvalitu života jak pediatrického pacienta, tak i celé jeho rodiny. Mají též významný vliv na morbiditu v dětském věku a představují jeden z hlavních důvodů dispenzarizace v pediatrii. Mezi nejvýznamnější onemocnění patří asthma bronchiale (AB), různé formy chronické bronchitidy, postižení plic předčasně narozených dětí (bronchopulmonální dysplazie – BPD/CLDI) a další. Bronchiální astma představuje jedno z nejčastějších chronických onemocnění dětského věku s prevalencí kolem 10 – 12 %. Různé formy chronické bronchitidy zodpovídají za další významnou část respirační morbidity. Krom nespecifických forem doprovázejících např. opakované aspirace, abnormity tracheobronchiálního stromu či různé formy imunodeficiencí sem patří podstatně vzácnější monogenně podmíněná onemocnění - cystická fibróza (CF, prevalence cca 1 : 6 400 dle dat z novorozeneckého screeningu) a primární ciliární dyskineze (PCD, 1 : 10 000 – 1 : 30 000 – odhadovaná prevalence). Tato onemocnění mají progresivní charakter, přičemž klinicky zjevná jsou až jejich pozdější stádia, která mohou progredovat až do respirační insuficience. Ještě vzácnější skupinou chronických plicních onemocnění jsou intersticiální plicní procesy dětského věku (chILD). Incidence této velmi heterogenní skupiny chorob se odhaduje na 1 : 100 000, což spolu s jejich nespecifickými a nenápadnými klinickými příznaky prvních stádií činí diagnózu mimořádně obtížnou. Ačkoliv prognóza těchto onemocnění je ve srovnání s dospělou populací obecně příznivější, je nutné jim též věnovat patřičnou pozornost.

Chronická respirační onemocnění představují léčitelná, ale v řadě případů nevléčitelná onemocnění. Zpravidla se jedná o pozvolna progredující choroby, které bez adekvátní léčby mohou končit fatálně. Naopak včas zahájená a správně vedená intervence může spolu s postnatálním růstem a vývojem respiračního traktu vést ke stabilizaci příznaků, event. jejich významnému zlepšení. Skutečnost, že tato onemocnění mohou dlouho probíhat skrytě a jejich klinické příznaky se opožďují za probíhajícími patologickými procesy, vysvětluje mimořádný význam jejich časně diagnostiky, která nemůže spočívat výlučně na detekci klinických příznaků (viz jejich malá senzitivita a specifita), ale musí z principu cílit na samotné patofyziologické změny v dýchacím traktu, které probíhají již od prvních – klinicky nenápadných – stádií. To vyžaduje široké uplatnění sofistikovaných diagnostických metod, které jsou schopny zachytit tyto nenápadné změny ve funkci i struktuře dýchacího traktu. Takovýto přístup pak umožní časnou a precizní diagnostiku, jejímž důsledkem bude i efektivnější léčba, která může zmírnit, eventuálně i zcela zabránit rozvoji ireverzibilních

změn. Předkládaná dizertační práce se bude zabývat současnými možnostmi detekce vybraných patofyziologických změn dýchacího traktu u dětí v časném stádiu chronického plicního onemocnění a jejich uplatněním v klinické praxi.



## **2. Patofyziologické změny dýchání u dětí s chronickým respiračním onemocněním**

Vznik a vývoj chronického respiračního onemocnění představuje složitý soubor navzájem provázaných procesů, které vedou ke strukturálním a funkčním změnám dýchacího traktu. Tyto procesy lze detekovat na různých úrovních – od subcelulární, až po úroveň orgánů resp. celého organismu. Jak již vyplývá z názvu, je tento proces pozvolný a odehrává se během řady týdnů, měsíců až let. V souvislosti s jeho progresí dochází k prohlubování patofyziologických změn, které jsou od určitého okamžiku již ireversibilní. V důsledku toho klesá efektivita léčebných intervencí, což představuje hlavní klinickou motivaci pro časnou diagnostiku chronických onemocnění.

První změny v rámci chronického onemocnění lze detekovat již na subcelulární úrovni (úroveň DNA, RNA, funkčních a strukturálních proteinů atd.). Možnosti jejich detekce jsou z obecného hlediska velmi náročné a stále patří – až na několik výjimek – spíše do oblasti výzkumu. Do této oblasti spadají například molekulárně-genetické, cytochemické, elektronmikroskopické a další diagnostické nástroje. S postupnou progresí onemocnění dochází ke změnám na úrovni buněk a tkání. Tyto patologické procesy lze z hlediska morfologického studovat např. v bioptických vzorcích pomocí cytochemických, histochemických a dalších histologických technik. Funkční pohled na tyto procesy mohou poskytnout např. elektrofyziologická vyšetření (transepiteliální potenciály apod.). Tyto diagnostické nástroje – opět až na několik málo výjimek představují těž především experimentální nástroje. S postupujícím vývojem lékařské vědy však lze očekávat jejich zavedení i do běžné klinické praxe (např. personalizovaná léčba cystické fibrózy modifikátory či korektory CFTR proteinu u pacientů s vzácnými mutacemi kauzálního genu testovaná pomocí intestinálních organoidů). Detekce patologických a patofyziologických změn na úrovni orgánů, orgánových systémů a i celého organismu je v současné době již běžnou součástí klinické praxe. Strukturální odchylky umožňují zachytit různé modifikace zobrazovacích technik (výpočetní tomografie s vysokým rozlišením, magnetická resonance, ultrazvuk atd.). Poruchu respirační a ventilační funkce dýchacího traktu jsou schopny odhalit různé techniky plicní funkční diagnostiky – od základních jako je spirometrie, pulzní oxymetrie až po sofistikované (např. test vícedechového vyplavování inertního plynu z plic - MBW, komplexní spiroergometrické vyšetření atd.). Výraznější odchylky na této úrovni již mohou mít svůj korelát i v klinických příznacích a mohou být detekovány prostým fyzikálním

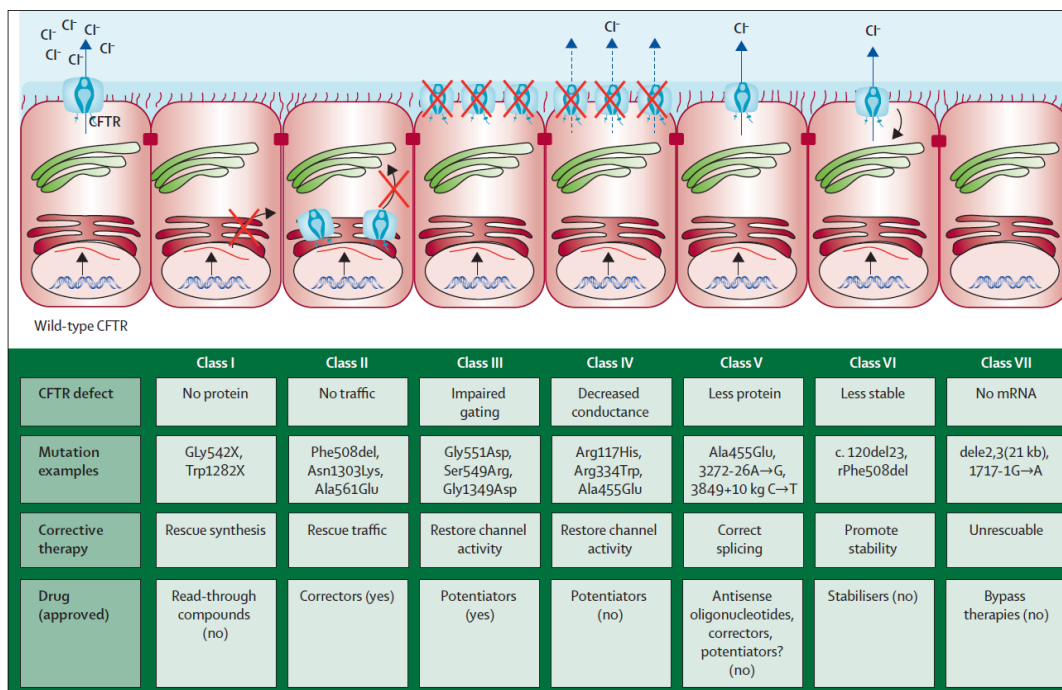
vyšetřením. Z uvedeného vyplývá, že přístup založený pouze na hodnocení klinických příznaků je nedostatečně senzitivní a neumožňuje včasné zahájení léčby chronického plicního onemocnění. Z tohoto důvodu je třeba věnovat pozornost metodám umožňujícím časnější detekci patofyziologických změn a na to navazující terapeutické intervence.

## **2.1. Změny na subcelulární úrovni**

Z obecného hlediska se na vzniku jakéhokoliv onemocnění podílí kombinace vlivů vnějšího prostředí a vrozených (geneticky daných) predispozic. Podíl exogenních a endogenních vlivů se mezi jednotlivými onemocněními liší, představuje tedy plynulé spektrum od víceméně pouze geneticky podmíněných stavů (např. tzv. monogenní choroby) přes multifaktoriálně způsobená onemocnění (polygenní dědičnost s vlivem vnějšího prostředí) až po onemocnění způsobená prakticky jen vnějšími vlivy (např. infekční onemocnění). Samozřejmě že i v těchto krajních případech lze diskutovat o – byť minimálním – podílu toho opačného aspektu (např. genetická vnímavost k infekčním chorobám, resp. epigenetické vlivy prostředí na monogenní onemocnění atd.).

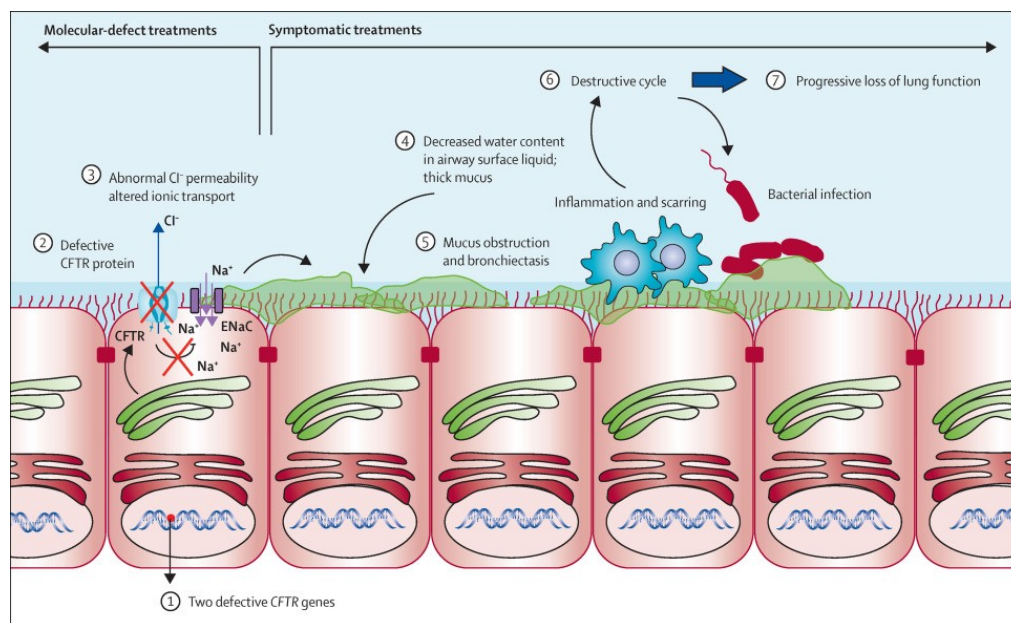
U některých chronických respiračních onemocnění jsou v dnešní době procesy na subcelulární úrovni vedoucí k jeho vzniku již poměrně podrobně objasněny. Příkladem může být cystická fibróza (CF), jejíž příčina byla odhalena v roce 1989 objevem kauzálního genu na dlouhém raménku 7. chromozomu (7q31.2), jehož mutace vedou ke vzniku defektního proteinu CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Defektní protein CFTR zodpovídá za narušený transepiteliální transport iontů, což následně vede ke změnám ve složení periciliární tekutiny, vzniku hustého hlenu a narušení samoočišťovací schopnosti dýchacích cest. Na základě mechanismu, kterým konkrétní mutace poškozuje funkci výsledného proteinu, klasifikujeme mutace do 6 (resp. již 7) tříd [De Boeck K, Amaral MD., 2016]. Tato klasifikace má dopad do klinické praxe, jelikož informuje o mechanismu účinku potenciální cílené léčby dle konkrétního genotypu pacienta – viz obrázek 2.1.1. V konečném důsledku pak porucha funkce CFTR proteinu stojí na počátku kaskády patofyziologických dějů vedoucích k zánětu, infekci a následně strukturálním a funkčním změnám dýchacího traktu na vyšších úrovních (obrázek 2.1.2). S rozvojem poznání se však i u této původně jednoznačně monogenně podmíněné choroby začaly objevovat další, tzv. modifikátorové geny (např. ENaC – Epithelium Sodium Channel), které mohou měnit fenotypové projevy jednotlivých mutací. Toto je jedno z vysvětlení klinicky velmi dlouho známé skutečnosti, že

u jednotlivých pacientů s cystickou fibrózou je pouze malá korelace mezi genotypem a fenotypovými projevy.



Obr. 2.1.1. Přehled tříd mutací CFTR genu včetně odpovídajících terapeutických strategií.

Převzato z práce: [De Boeck K, Amaral MD., 2016].



Obr. 2.1.2. Kaskáda patofyziologických dějů vedoucí k rozvoji typických fenotypových příznaků cystické fibrózy.

Převzato z práce: [De Boeck K, Amaral MD., 2016].

Primární ciliární dyskineze (PCD) představuje další modelový příklad jasně geneticky podmíněného chronického respiračního onemocnění. Ačkoliv je o této chorobě známo podstatně méně než o cystické fibróze, do současné doby bylo již objeveno 43 kauzálních mutací způsobujících toto onemocnění (mezi nejčastějšími to jsou DNAH5 – Dynein Axonemal Heavy Chain 5 a DNAI1 – Dynein Axonemal Intermediate Chain 1, oba kódující zevní dyneinové raménko, z dalších pak CCDC40, HYDIN, SPAG1 atd.). Tyto geny jsou lokalizovány na několika chromozomech (5., 7., 17. atd.) a způsob přenosu onemocnění je v drtivé většině případů autosomálně recesivní, vzácně jsou popsány i případy autosomálně dominantní a X-vázané. Předpokládá se, že zmíněný počet kauzálních genů není konečný, jelikož na komplexní struktuře řasinky se podílí zhruba 250 proteinů. Mutace daného kauzálního genu pak vede k úplné absenci či poruše funkce odpovídajícího strukturálního proteinu axonematu. V důsledku toho je narušena i funkce celé řasinky projevující se její dyskinezí či akinezí. Jak tyto strukturální, tak i funkční změny řasinek lze v současné době vyšetřovat v klinické praxi – např. pomocí elektronové mikroskopie a imunofluorescenčního průřezu strukturálních proteinů řasinky (strukturální změny) nebo pomocí vysokorychlostní videomikroskopie (funkční změny). Primární ciliární dyskineze tak představuje jedno z onemocnění, kde má diagnostika subcelulárních změn přímý diagnostický význam.

Asthma bronchiale patří mezi nejčastější chronická respirační onemocnění. V současné době není považováno za homogenní chorobu, ale za syndrom, u kterého různé patofyziologické procesy mají společnou klinickou manifestaci (bronchiální hyperreaktivita s opakovanými epizodami, alespoň částečně reversibilní bronchiální obstrukce projevující se kašlem, dušností, pískoty, pocitem tlaku na hrudi, zahleněním apod.). Z tohoto důvodu se pak hovoří o různých endotypech a fenotypech astmatu, jejichž rozlišení má význam např. pro cílené nasazení léčby (koncept personalizované léčby). V klasickém pojetí je asthma bronchiale považováno za multifaktoriálně podmíněné onemocnění, na jehož vzniku se podílejí jak genetické vlivy, tak vlivy zevního prostředí. Dokládají to studie zabývající se rizikem vzniku astmatu u jedince v souvislosti s výskytem této nemoci v jeho rodině. U jedinců zcela bez rodinné zátěže je riziko kolem 5 %. V případě prvostupňových příbuzných trpících astmatem toto riziko narůstá na 25 %, u dvojvaječných dvojčat se pohybuje kolem 35 % a nejvyšší je u jednovaječných dvojčat (75 %). Způsob dědičnosti asthma bronchiale se označuje jako polygenní, čili na jeho rozvoji se podílí řada genů. Na základě asociačních genomových studií bylo do dnešní doby vytypováno přes 100 genů (zejména na dlouhých raménkách chromozomu 2, 5, 6, 12 a 13), které jsou asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje asthma bronchiale. Tyto geny z obecného hlediska ovlivňují funkci imunitního systému,

sliznice dýchacího traktu apod. Mezi nejčastěji diskutované patří např. gen pro ADAM33 (A disintegrin and metalloproteinase 33), který je významně exprimován v bronchiálních hladkých svalech a plicních fibroblastech a je dáván do souvislosti s bronchiální hyperreaktivitou a remodelací dýchacích cest. Dalším z genů je gen pro filaggrin nacházející se na krátkém raménku 1. chromozomu (1q21). Primárně je tento gen dáván do souvislosti s atopickou dermatitidou (jeho mutace se vyskytuje až u 50 % těchto pacientů) ale může hrát roli i v rozvoji alergické senzibilizace (viz dříve zmíněná porucha funkce sliznice dýchacího traktu) a bronchiální hyperreakivity. Z faktorů vnějšího prostředí se na rozvoji asthma bronchiale podílí prenatální expozice cigaretovému kouři, výživa matky v těhotenství a stres. Významnou roli má i postnatální výživa dítěte (kojení), infekce, expozice alergenům atd. Všechny tyto faktory mohou ovlivňovat expresi různých genů, což pak vede ke změnám fenotypu buněk podílejících se na rozvoji asthma bronchiale (hladké svalové buňky, fibroblasty, epitelie, žírné buňky, eozinofily, dendritické buňky atd.). V důsledku toho pak dochází k remodelaci dýchacího traktu (změny na úrovni buněk a tkání), která se projevuje strukturálními a pravděpodobně i funkčními změnami.

Intersticiální plicní procesy představují skupinu vzácných onemocnění postihujících primárně interalveolární septa plicního parenchymu a samotné alveoly. V průběhu onemocnění se patologický proces může rozšířit i na další struktury dýchacího traktu (průdušky, cévy, pleura atd.). Vzhledem k jejich složité etiopatogenezi byla řada těchto onemocnění označována jako idiopatická. V poslední době se ovšem podařilo ozřejmit příčiny vzniku řady z nich – jedná se např. o monogenní onemocnění ze skupiny poruch surfaktantu (mutace genů pro surfaktantový protein B a C – SFTPB a SFTPC, dále pak ABCA3 (ATP-binding cassette transporter A3), event. i CSF2RA a CSF2RB (gen pro  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec receptoru pro faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů – GM-CSF). Objasnění příčiny vzniku těchto onemocnění představuje zásadní krok k jejich jednoznačné diagnostice a v delším časovém horizontu event. i pro vývoj jejich cílené léčby.

Celkově lze tedy konstatovat, že s rozvojem našich znalostí etiopatogeneze chronických plicních onemocnění se za pomoci sofistikovaných metod umožňujících detekci patofyziologických změn na subcelulární úrovni daří diagnostikovat stále větší část pacientů v časných a potencionálně reversibilních stádiích onemocnění, což má význam i pro dlouhodobou prognózu onemocnění.

## 2.2. Změny na úrovni buněk a tkání

Přestavbové změny dýchacího traktu (airway remodeling) odehrávající se na úrovni buněk a tkání zahrnují komplex strukturálních změn, které nemají vztah k udržování jeho normální funkce (definice dle: [Jeffery PK., 2001]). Tyto změny tedy představují patologický proces, který v různé míře postihuje struktury jak stěny dýchacích cest, tak i dalších částí dýchacího traktu (plicní sklípky, interalveolární septa, atd.). Lokalizace a charakter těchto změn se u jednotlivých respiračních onemocnění liší. Nejvíce zpráv o remodelaci dýchacího traktu pochází od pacientů s asthma bronchiale, u dospělých pak i s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN). První histologické popisy plic pacientů s fatálním astmatem se začínají objevovat na počátku druhé poloviny 20. století [Houston JC. et al., 1953], [Dunnill MS. et al. 1969], [Cutz E. et al., 1978]. S rozvojem fibroendoskopických technik bylo možné již na konci 80. let studovat remodelační změny s využitím endobronchiálních biopsií [Jeffery PK et al., 1989], které přinesly informaci o remodelaci dýchacího traktu i u pacientů s méně závažným onemocněním podstupujících klinicky indikovanou bronchoskopii. Hlavní rozvoj pak nastal na přelomu tisíciletí, kdy byla publikována řada studií zahrnujících i nejmenší děti [Laitinen LA. et al., 1996], [Pohunek P. et al., 2005], [Saglanı S. et al., 2007], [Berankova K. et al., 2014].

Krom asthma bronchiale jsou přestavbové změny velmi dobře zdokumentovány též u pacientů s cystickou fibrózou. Ačkoliv na počátku 20. století u těchto pacientů dominovala gastrointestinální a metabolická problematika (malabsorpční syndrom, iontový rozvrat), s rozvojem znalostí patogeneze tohoto onemocnění a na něj navazujícím zavedením odpovídajících léčebných postupů se později ukázal multiorgánový charakter tohoto onemocnění a do popředí diagnostického i terapeutického zájmu se dostalo plicní postižení. Od 70. let 20. století jsou k dispozici podrobné morfologické studie sekčních vzorků plic pacientů s CF [Bedrossian CW. et al., 1976], [Sobonya RE., Taussig LM., 1986.], na přelomu tisíciletí se pak objevují práce hodnotící remodelační změny ve vzorcích endobronchiálních biopsií, postupně jsou získávána data i od nejmenších dětí [Durieu I. et al., 1998], [Hilliard TN. et al., 2007], [Regamey N. et al., 2008]. Podstatně méně informací je k dispozici od pacientů s jinými formami chronické bronchitidy, respektive tzv. non-CF bronchiektáziemi – např. primární ciliární dyskinezi [Regamey N. et al., 2008], [Hoňková L. et al., 2014].

Ačkoliv první práce v oblasti remodelace dýchacích cest u asthma bronchiale předpokládaly, že některé strukturální změny jsou pro tuto nemoc patognomonické (např. ztlustění bazální membrány), novější práce ukazují, že remodelace obecně je do značné míry nespecifický proces a obdobné přestavbové změny lze nalézt u zcela odlišných chronických

zánětlivých onemocnění dýchacího traktu [Regamey N. et al., 2008], [Hoňková L. et al., 2014]. Ačkoliv bylo do současné doby popsáno široké spektrum různých remodelačních změn postihujících sliznici dýchacích cest (epitel, bazální membrána, extracelulární matrix, slizniční žlázy a pohárkové buňky), hladkou svalovinu, cévy a další struktury, nejvíce se v dalším textu budeme věnovat změnám bazální membrány, které patří mezi nejlépe sledovatelné, a tedy i nejlépe zdokumentované.

Bazální membrána je acelulární vrstva nacházející se bezprostředně pod epitelem dýchacích cest tvořená různými glykoproteiny, proteoglykany a glykosaminoglykany. V elektronovém mikroskopu lze diferencovat její dvě podvrstvy – širokou laminu reticularis a tenkou laminu basalis. Lamina basalis se nachází bezprostředně pod epitelovými buňkami a její šířka je ~80 nm. Ve světelném mikroskopu ji lze zobrazit nepřímo pomocí imunohistochemického průkazu jejích strukturálních glykoproteinů (hlavní komponenta - kolagen IV, dále laminin). Lamina reticularis je podstatně širší (~ 4  $\mu$ m), při klasickém barvení hematoxylin-eozin se ve světelném mikroskopu zobrazuje jako homogenní eozinofilní linka hyalinního vzhledu. V literatuře též bývá někdy označována jako retikulární bazální membrána (reticular basement membrane – RBM). Je tvořena především kolagenem III, dále pak kolageny I, V a tenascinem. V rámci remodelačních změn může docházet jak ke kvantitativním, tak i kvalitativním (strukturálním) změnám obou vrstev bazální membrány.

Kvantitativní změny zahrnují změny její šíře – především ztlustění. V současné literatuře je dostupná jediná práce hodnotící šířku bazální membrány zdravých jedinců v průběhu života [Tsartsali L. et al., 2011]. Zahrnuje data z plicních preparátů získaných post-mortem od jedinců bez respirační morbidity. Věkové spektrum sahá od předčasně narozených dětí (od 22. týdnu gestace) až po dospělé. Autoři prokázali signifikantní a nelineární vztah mezi věkem a šířkou bazální membrány (BM). V průběhu dětství šířka BM narůstala, zatímco po 18. roce života byl zaznamenán její pozvolný pokles. Tento vztah však nebyl prokázán u dětí s respirační patologií, patrně z důvodu překrytí tohoto fenoménu vlastním procesem remodelace – viz následující citace. Zesílení bazální membrány bylo původně považováno za patognomonický znak asthma bronchiale [Roche WR. et al., 1989], [Brewster CE. et al., 1990] nicméně v současné době existuje řada prací toto zpochybňující a prokazujících obdobné změny i u jiných diagnóz [Regamey N. et al., 2008], [Hoňková L. et al., 2014]. Naše data získaná v rámci řešení projektu GAUK č. 60715 jsou s těmito údaji ve shodě [Koucky V. et al., 2018], [Koucky V. et al., *Pediatr. Pulmonol*, 2019], [Koucky V. et al., *Chest* 2019]. Na základě výše zmíněných studií lze tedy vyslovit hypotézu, že remodelační změny, resp. zesílení bazální membrány je výsledkem obecného patofyziologického mechanismu

probíhajícího v průduškách s chronickým zánětem. Detailní charakteristiky (např. zastoupení jednotlivých strukturálních proteinů) a funkční důsledky se však u jednotlivých onemocnění mohou lišit (např. v závislosti na typu zánětu – eozinofilní vs. neutrofilní).

### **2.3. Změny na úrovni orgánů a celého organismu**

Změny na úrovni orgánů a celého organismu jsou považovány za relativně pozdní manifestaci chronického plicního onemocnění. Jedná se vesměs o již závažné a nevratné narušení struktury a/nebo funkce dýchacího traktu, které má zpravidla i jednoznačné klinické projevy. Mezi nejčastější příznaky chronických respiračních onemocnění patří kašel, expektorace sputa, abnormální zvukové fenomény (vrzoty, pískoty), dušnost (nejprve po zátěžová, později i klidová), vzácněji cyanóza, paličkovité prsty, hemoptýza apod. Senzitivita a specifita těchto příznaků je však relativně nízká, v časných stádiích onemocnění tyto známky většinou chybí. Proto je tendence využívat různé biomarkery, které jsou k těmto změnám citlivější a navíc umožňují i jejich objektivní hodnocení včetně vývoje v čase. U řady chronických plicních onemocnění (astma, cystická fibróza) bylo vytipováno množství biomarkerů [Tiotiu A., 2018], [Shoki AH. et al., 2013], [Scott LK., Toner R., 2017], [Sagel SD. et al., 2012], některé z nich našly později uplatnění i přímo v klinické praxi (např. pro detekci akutní exacerbace, monitoraci průběhu onemocnění, efektu léčby atd.). Parametry funkce plic, strukturální změny dýchacího traktu hodnocené na základě RTG či CT hrudníku a hladiny různých prozánětlivých ukazatelů v krvi či jiných tělesných tekutinách představují nejčastěji využívané biomarkery, které mají schopnost zachytit různé aspekty patofyziologických a patologických změn dýchacího traktu dříve než klinické příznaky či prosté fyzikální vyšetření.

Z teoretického hlediska lze změny respiračního systému probíhající na úrovni orgánů rozdělit na poruchy funkce a poruchy struktury (makroskopické změny). Reálná situace je však složitější, jelikož struktura a funkce dýchacího traktu se mohou navzájem významně ovlivňovat. Např. u cystické fibrózy jsou k dispozici studie zabývající se vztahem strukturálních a funkčních změn [Gustafsson PM. et al., 2008], [Horsley AR. et al., 2013] prokazující jejich úzký vztah. V tomto případě parametry funkce plic (např. spirometrické ukazatele – FEV<sub>1</sub> a MEF<sub>25</sub> či parametry nehomogenity ventilace plic – LCI) korelují se strukturálními změnami hodnocenými na základě HRCT hrudníku. Naopak u primární ciliární dyskineze takovýto vztah nebyl dosud jednoznačně prokázán. Např. Irving et al. nenalezli korelaci mezi parametry funkce plic (FEV<sub>1</sub> a LCI) a strukturálními změnami na HRCT



[Irving SJ. et al., 2013]. Navíc nebyl zjištěn ani signifikantní vztah mezi LCI a FEV<sub>1</sub> ukazující na pravděpodobnou nezávislost patofyziologických procesů v centrálních a nejperifernějších dýchacích cestách. Naopak Boon et al. ve své práci našli signifikantní korelaci mezi LCI a změnami na HRCT plic. Parametr FEV<sub>1</sub> se ukázal jako málo senzitivní marker časného strukturálního poškození u PCD [Boon M. et al., 2015].

### **2.3.1. Funkční změny**

Porucha funkce plic představuje velmi častý nález u různých chronických respiračních onemocnění. Konečným stadiem je respirační insuficience 2. typu (hypoxemie s hyperkapnií), resp. respirační selhání. Do něho mohou s postupem času progredovat všechna chronická respirační onemocnění. Naopak v časnějších stádiích je funkční poškození rozmanitější a lze definovat obecné vzory poškození, které jsou víceméně typické pro danou skupinu chorob. Takto hovoříme o obstrukčních, restričních a smíšených poruchách ventilace.

Asthma bronchiale je v klasické podobě spojeno s obstrukcí periferních dýchacích cest, která mívá intermitentní charakter. Spolu s obstrukcí periferních dýchacích cest se rozvíjí i statická hyperinflace plicní. Samotná obstrukce je způsobena kontrakcí hladké svaloviny (bronchospasmus), hypersekrecí hlenu a otokem sliznice dýchacích cest. Důležitou vlastností stěny průdušek je jejich hyperreaktivita vedoucí k epizodickému zužování. Tyto patofyziologické aspekty jsou zvýrazněny v průběhu akutní exacerbace, kdy obstrukce může dosáhnout takového stupně, že vede k typickým poslechovým fenoménům (pískoty a vrzoty objevující se při zúžení průsvitu dýchacích cest na 1/2 až 1/3 původního), ještě výraznější obstrukce pak může vyústit v pocit dušnosti či objektivní známky dechové tísně. Naopak v klidovém stadiu onemocnění může být obstrukční ventilační porucha klinicky nemá a ani základní přístrojová vyšetření plicních funkcí (spirometrie) nemusí odchytky od normy odhalit. Novější práce však ukazují, že i v těchto časných, resp. klinicky němých stádiích onemocnění s normální spirometrií, lze poruchu funkce plic detekovat pomocí senzitivnějších metod. Jedná se zejména o poruchu homogenity ventilace hodnocenou pomocí testu vícedechového vyplavování inertního plynu z plic [Macleod KA. et al., 2009], případně i impulzní oscilometrií (jedna z modifikací techniky nucených oscilací). U obou metod byla prokázána vyšší senzitivita k časným stádiím onemocnění [Racette C. et al., 2018], [Gustafsson PM., 2007], [Song TW. et al., 2008]. Tato vyšetření tak mohou přinést vhled do patofyziologických změn dýchání již u pacientů s časnými stádii bronchiálního astmatu.

Z hlediska klinické praxe pak mohou přispět k časnému stanovení diagnózy resp. k pečlivému monitorování dlouhodobého průběhu tohoto onemocnění.

Obstrukční ventilační poruchu lze detekovat též u cystické fibrózy. Klasicky se jedná o ireverzibilní zúžení průdušek, jehož hlavním mechanismem je hypersekrece a stagnace abnormálně vazkého hlenu v dýchacích cestách, se kterou je spojen chronický zánět a infekce. Na rozdíl od asthma bronchiale je zde podíl bronchospasmu méně významný, avšak nelze ho zcela vynechat [Hiatt P. et al., 1988]. Za typický nález u rozvinutých forem cystické fibrózy považujeme snížení průtoků dýchacími cestami při usilovném výdechu. Nicméně vzhledem ke skutečnosti, že hodnocení průtoků může být nedostatečně citlivé k postižení nejperifernějších dýchacích cest (a tedy časným stádiím onemocnění), je zvláště u kojenců a malých dětí vhodné doplnit metodu MBW, která hodnotí nehomogenitu ventilace jakožto odraz patologie nejperifernějších průdušek. Existuje totiž řada studií, které ukazují, že určité reziduální postižení může být touto metodou detekováno i u dětí s normální spirometrií [Gustafsson PM. et al., 2003], [Aurora P. et al., 2005], respektive již u kojenců ve věku 3 měsíců diagnostikovaných novorozeneckým screeningem [Hoo AF. et al., 2012].

Intersticiální plicní onemocnění jsou považována za klasické příklady restriktivní poruchy ventilace. Ačkoliv existuje několik výjimek z tohoto pravidla (zejména v kojeneckém věku – např. hyperplazie neuroendokrinních buněk – NEHI s výraznou obstrukční ventilační poruchou [Kerby GS. et al., 2013]), častěji se setkáváme s restriktivním vzorem postižení. Klasickými klinickými jednotkami z této skupiny poruch je deficiencie surfaktantového proteinu C (dříve chronická pneumonitis kojence) a plicní intersticiální glykogenóza (PIG). Typické změny lze pozorovat již na klidovém dechovém vzoru (metoda analýzy klidového dechového vzoru) – kojenec dýchá rychleji a mělce, což se odráží v nárůstu dechové frekvence (RR) a event. i minutové ventilace (VE) spolu s nárůstem ventilace mrtvého prostoru. Výdech nebývá prodloužen, naopak poměr doby nádechu ku výdechu ( $t_I/t_E$ ) bývá okolo 1,0. Dechový objem ( $V_t$ ) v prvních fázích onemocnění zůstává zachován, až u pokročilejších forem onemocnění, kde je plně vyjádřena „tuhá plíce“, lze registrovat jeho pokles. Dalším charakteristickým nálezem je snížení poddajnosti dýchacího traktu ( $C_{rs}$ ) či samotných plic ( $C_L$ ) – tzn. jejich „tuhnutí“. Tento parametr pravděpodobně odráží strukturální změny v plicním parenchymu (zánětlivá infiltrace, event. i fibrotizace), nicméně studie korelující bioptický nález plic a funkční nález nejsou k dispozici. Parametr  $C_{rs}$  se ukázal jako klinicky velmi hodnotný, jelikož byla prokázána jeho korelace s klinickým průběhem onemocnění [Kerem E. et al., 1990] a jeho zlepšení bylo pozorováno s určitým odstupem po zahájení léčby u pacientů s deficiencí surfaktantového proteinu C [Hevroni A. et al., 2015].

Ačkoliv vyšetření transferfaktoru plic pro oxid uhelnatý (CO) u nespolupracujících dětí není běžně dostupné (není k dispozici komerčně vyráběný přístroj) existuje jedna práce, která udává snížení parametru  $DL_{CO}$  u kojenců s PIG a jeho příznivou odpověď na léčbu [Ehsan Z. et al., 2014]. U chILD jsou popsány též typické změny plicních objemů. Klasicky dochází k redukci usilovně vydechnuté vitální kapacity (FVC). Naopak funkční reziduální kapacita (FRC) může být postižena v různém směru – snižena (klasický restriktivní vzor tak, jak ho známe např. u dospělých s idiopatickou plicní fibrózou), případně i v normě až zvýšená. Patofyziologický mechanismus této změny nebyl dosud přesně objasněn. Spekuluje se, že může odrážet počínající air-trapping (viz zvýšený poměr FRC/TLC jakožto známka air-trappingu). Obdobné změny pak postihují i celkovou plicní kapacitu (TLC). Ta je klasicky snižena, při určitém stupni air-trappingu však může být normální až zvýšená. Závěrem je třeba zmínit průtoky v dýchacích cestách při usilovném výdechu (metoda TV-RTC či RV-RTC), které – zejména pokud jsou vztaženy k FVC či TLC – bývají až supranormální. Informace o změnách LCI u kojenců s chILD nejsou dosud k dispozici.

### **2.3.2. Strukturální změny**

Makroskopické strukturální změny dýchacího traktu u chronických respiračních onemocnění mohou postihovat jeho nejrůznější části – průdušky, plicní parenchym (interalevolární septa, vlastní alveoly) i pleuru. Jejich rozsah, distribuce a charakter se mezi jednotlivými onemocněními liší a typický vzor postižení v řadě případů zásadním způsobem napomáhá v diagnostickém procesu. Ačkoliv pokročilejší strukturální změny lze detekovat již na prostém RTG snímku hrudníku, v současné době je za zlatý standard považováno CT hrudníku s vysokým rozlišením (HRCT).

U pacientů s cystickou fibrózou a dalšími formami chronické bronchitidy (např. primární ciliární dyskineze) patří mezi nejčastější strukturální změny: 1. zesílení stěny průdušek, 2. stagnace hlenu, 3. příznak pečetního prstenu, 4. příznak kolejnice (chybějící pokles průměru průdušek směrem do periferie), 5. přítomnost bronchiálních struktur v plicní periférii, 6. mozaiková perfúze a ventilace plicního parenchymu a 7. bronchiektázie [Chang AB et al., 2018]. V klasickém pojetí je bronchiektázie definována jako ireverzibilní rozšíření průdušek. Rozšíření lumina průdušky se vztahuje k přilehlé cévě, kdy poměr vnitřního průměru bronchu k celkovému průměru cévy přesahuje 1,0. Nicméně nověji je tato hranice zpochybňována, zejména kvůli nízké senzitivitě v dětském věku (původní poměr 1,0 byl stanoven ve studii na dospělých pacientech). Z tohoto důvodu byla navržena hranice poměru

průduška-céva 0,8 [Kapur N et al., 2011]. Tato hodnota vychází z faktu, že u dětí ve věku do 5 let bez aktuálních známek respirační infekce bylo rozmezí poměru průměr průdušky ku cévy 0,49 – 0,58 s horním limitem normy 0,76 [Long FR et al., 2004]. I samotná ireverzibilita bronchiektázií je nyní zpochybňována. Zaprvé, samotný průkaz ireverzibility vyžaduje alespoň dvě vyšetření HRCT v odstupu, což je v klinické praxi vzhledem k vysoké radiační zátěži málokdy provedeno. Dále též existují práce prokazující regresi bronchiektatických změn u intenzivně léčených dětí.

U pacientů s asthma bronchiale lze makroskopických strukturálních změn pozorovat podstatně méně. CT je většinou prováděno s cílem vyloučit jinou respirační patologii. Nicméně i u těchto pacientů lze pomocí CT s dostatečně velkým prostorovým rozlišením nalézt odchylky od normy – např. zesílení stěny bronchů a nehomogenitu distribuce ventilace/perfúze [de Blic J., Scheinmann P., 2007]. Naopak zcela zásadní je CT hrudníku pro diagnózu intersticiálních plicních procesů [Guillerman RP., 2010]. V řadě případů lze na základě typických radiologických změn a jejich distribuce stanovit diagnózu intersticiálního plicního procesu a poměrně přesně ho i specifikovat. Mezi charakteristické nálezy u těchto pacientů patří „crazy paving“, „tree in bud“, „ground glass opacities“ a „honeycombing“. Tyto názvy se většinou do češtiny nepřekládají, nicméně jsou jednoznačně specifikovány [Hansell DM. et al., 2008].

Pro kvantifikaci makroskopických strukturálních změn pomocí HRCT byly vyvinuty různé skórovací systémy. Nejvíce dat pochází od pacientů s cystickou fibrózou [Bhalla M. et al., 1991], [Helbich TH. et al., 1999], [Brody AS. et al., 2006]. Nejčastěji používaný je v současné době ten posledně jmenovaný. Takovýto skórovací nástroj umožňuje relativně objektivní monitoraci průběhu onemocnění v čase a zároveň i hodnocení efektu léčebných intervencí.

Z výše zmíněného je patrné, jak komplexní charakter mají strukturální a funkční změny dýchacího traktu chronicky nemocného dítěte. Tomu odpovídá i široké spektrum diagnostických nástrojů popsaných v následující kapitole 3. Jejich cílené užití v klinické praxi umožňuje jednak časnou diagnostiku jednotlivých onemocnění, ale i odvození racionálních léčebných postupů.

### **3. Nástroje detekce časných patofyziologických změn dýchacího traktu**

V této kapitole budou zmíněny nejdůležitější diagnostické nástroje, které lze využít k detekci časných patofyziologických i patologických změn dýchacího traktu u malých dětí s chronickým respiračním onemocněním. Vzhledem k zaměření předkládané práce bude nejvíce prostoru věnováno plicní funkční diagnostice a důraz bude kladen na využití těchto metod v klinické praxi.

#### **3.1. Molekulárně-genetická analýza**

V současné době existuje řada nástrojů pro detekci kauzálních mutací genů zodpovědných za rozvoj různých chronických respiračních onemocnění. V zásadě existují dva přístupy k tomuto problému: za prvé – cílený průkaz mutací v předem vytipovaném genu/genech, a za druhé – vyšetření velkého množství (potažmo všech) genů pomocí celoexomového resp. celogenomového sekvenování následované podrobnou genetickou analýzou.

V současné době není molekulárně-genetické vyšetření u pacientů s chronickým respiračním onemocněním využíváno často. Rutině je prováděno u pacientů s CF, aktuálně je snaha ho v České republice zavést i do diagnostického protokolu pacientů s podezřením na PCD (v některých jiných státech je však do diagnostického protokolu již plně integrováno). Určitou roli hraje toto vyšetření také u vybraných forem intersticiálních plicních onemocnění (podezření na poruchy surfaktantu, vzácné syndromologické formy chILD). Nicméně vzhledem k rychlému rozvoji poznání na poli genetiky respiračních onemocnění lze v dohledné době předpokládat narůstající význam molekulárně genetických metod i u pacientů s chronickým respiračním onemocněním.

#### **3.2. Detekce funkčních změn dýchacího traktu**

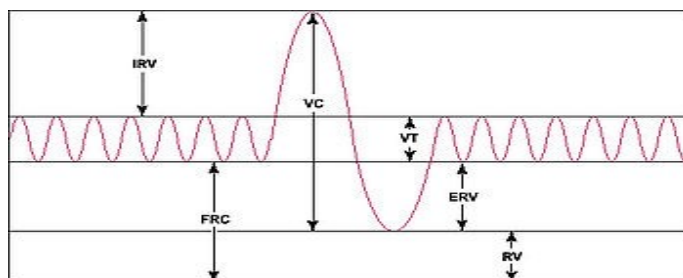
Funkční diagnostika představuje neobyčejně širokou oblast respirační medicíny nedílně spjatou s patofyziologií dýchání. Dvě základní funkce respiračního traktu zahrnují:

1. ventilaci – tzn. transport dýchacích plynů ( $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$ ) mezi alveoly a okolním vzduchem,
2. respiraci – tzn. výměnu plynů mezi alveoly a krví, přičemž na tuto respirační funkci úzce navazuje perfúze, která zajišťuje dodávku okysličené krve do tkání.

Z teoretického hlediska bývají tyto funkce oddělovány a jednotlivé vyšetřovací metody cílí primárně na jednu z nich. Nicméně z funkčního pohledu je nutné vnímat tyto děje provázaně. Vzhledem ke komplexnosti funkce plic pak nepřekvapí široké spektrum diagnostických metod používaných v běžné praxi. Dosud totiž neexistuje a ani se nepředpokládá vznik jedné diagnostické metody, která by byla schopna zhodnotit všechny aspekty funkce plic naráz. K tomuto účelu je třeba zkombinovat řadu různých metod, což jako jediné může poskytnout komplexní pohled na funkční stav dýchacího traktu.

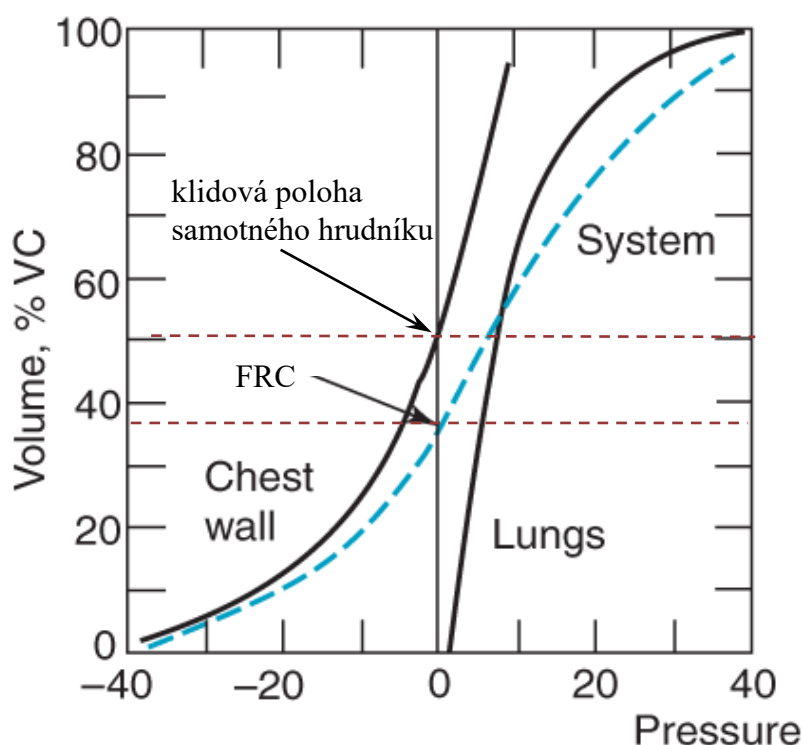
### 3.2.1. Vyšetření ventilace

Metody určené k vyšetření ventilace plic hodnotí činnost ventilační pumpy resp. jejích součástí. V konečném důsledku je posuzována efektivita ventilace alveolů, která má za cíl udržet stabilní složení alveolárního vzduchu. Ventilační pumpa se skládá ze dvou základních částí: 1. hrudní stěna (žebra, sternum, hrudní páteř a jejich skloubení, dále dýchací svaly a vazivové struktury hrudníku) a 2. strukturální části plice (plicní parenchym, dýchací cesty). Obě složky jsou spojeny pleurou v jeden celek. Práce dechových svalů se spotřebovává na činnost ventilační pumpy, resp. k překonání dynamických a statických odporů. Dynamické odpory jsou dány třením proudícího vzduchu o stěnu dýchacích cest a dále třením jednotlivých pohybujících se částí ventilační pumpy. Statický odpor klade ventilační pumpa svému rozepnutí (zvětšení objemu) mj. na podkladě elasticity plicní tkáně. Na základě výše zmíněných fyziologických principů lze i odvodit hlavní aspekty ventilační funkce plic, které jsou v praxi vyšetřovány – plicní objemy (viz obrázek 3.2.1), pružné vlastnosti dýchacího traktu (poddajnost a odpor plic, resp. celého dýchacího traktu – tzn. jejich mechanika, obrázek 3.2.2), odpor (centrálních a periferních) dýchacích cest a síla dechových svalů.



Obr. 3.2.1. Statické plicní objemy zobrazené na křivce objem-čas (spirogram).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vt – klidový dechový objem, VC – vitální kapacita (zde maximální objem vzduchu vydechnutý po maximálním nádechu), IRV – inspirační reziduální objem (maximální objem vzduchu nadechnutý navíc po klidovém nádechu), ERV – expirační reziduální objem (maximální objem vzduchu vydechnutý navíc po



Obr. 3.2.2. Poddajnost dýchacího traktu a její podsložky<sup>2</sup>

Upraveno podle: Levitzky MG: Pulmonary Physiology, Eight Edition (Lange Physiology Series), ISBN-13: 978-0071793131

### 3.2.1.1. Vyšetření ventilační funkce plic u nespolupracujících dětí

K vyšetření funkce plic v běžné klinické praxi je vždy třeba určité úrovně spolupráce vyšetřovaného. Obecně můžeme konstatovat, že akceptovatelné kvality funkčního vyšetření, které je založeno pouze na klidovém dechovém vzoru (např. impulzní oscilometrie, analýza klidového dechového vzoru), lze dosáhnout u dítěte ve věku 2 – 3 let; vyšetření vyžadující

---

klidovém výdechu), FRC – funkční reziduální kapacita (objem vzduchu v plicích na konci klidového výdechu), RV – reziduální objem (objem vzduchu v plicích po maximálním výdechu).

<sup>2</sup> Křivky poddajnosti plic (Lungs, plná čára), hrudní stěny (Chest wall, plná čára) a celého dýchacího traktu (Systém, přerušovaná čára) znázorňují závislost změny objemu (zde vyjádřeno na svislé ose v % vitální kapacity) na změně tlaku (vodorovná osa) - tzv. PV diagram. Na objemové úrovni odpovídající funkční reziduální kapacitě (FRC) se vyrovná retrakční tlak plice a hrudní stěny. Dýchací trakt jako celek tak zaujme klidovou polohu odpovídající úrovni pasivního výdechu (FRC). Objemová hladina, na které protíná křivka poddajnosti samotné hrudní stěny (Chest wall) svislou osu, odpovídá klidovému objemu, který zaujme hrudník v případě, že není spojen s plicí (např. při pneumotoraxu).

usilovný a dlouhý výdech/nádech je proveditelné u dítěte ve věku 3 – 5 let. U dětí mladších a jinak nespolupracujících je nutno použít alternativní metody, běžně označované jako iPFT – infant pulmonary function testing. Pojem „nespolupracující děti“ není definován věkem, ale schopností kooperace dítěte při vyšetření tak, aby provedlo požadované dechové manévry (např. usilovný a dlouhý výdech, zadržení dechu atd.). Tuto hranici je třeba hodnotit vždy individuálně. Schopnost kooperace závisí v první řadě na stupni psychomotorického vývoje; centrální nervový systém musí být dostatečně vyzrálý, aby dítě pokyny pochopilo a mělo dostatečnou koordinaci dechových svalů pro provedení manévru. Další faktorem je i míra „zkušeností dítěte se zdravotnictvím“. Ukazuje se, že chronicky nemocné dítě, které je od útlého věku trénováno např. v dechové rehabilitaci (tzn. určité formě práce s dechovým vzorem), je schopno požadovaný manévr při funkčním vyšetření plic provést mnohem dříve než dítě, které je v prostředí funkční laboratoře poprvé, byť je i starší. Podceňovat nemůžeme ani vliv vyšetřujícího a prostředí laboratoře samotné, které samozřejmě na dítě a jeho spolupráci též působí. Plicní funkční diagnostika pro nespolupracující děti se tedy zásadním způsobem liší od metod pro děti spolupracující, u kterých lze použít s drobnými modifikacemi metody pro dospělé.

Metody iPFT provádíme ve spánku tak, abychom zajistili dostatečně pravidelný klidový dechový vzor a dobrou toleranci obličejové masky. Přirozený spánek lze využít k vyšetření prakticky výhradně jen u novorozenců, u starších dětí používáme spánek uměle navozený. Standardně je používán chloralhydrát v dávce 50 – 120 mg/kg, aplikovaný orálně nebo rektálně. Na našem pracovišti se osvědčilo rektální podání, jednak z důvodu ne zcela příjemné chuti chloralhydrátu, jednak z důvodů snahy vyšetření provádět u lačného dítěte (snížení rizika aspirací zejména při vyšetření s provedením rychlé torakoabdominální komprese). Rektálně podáváme suspenzi chloralhydrátu ve slunečnicovém oleji s koncentrací 100 mg/ml. Chloralhydrát patří mezi bezpečné a dobře tolerované léky s minimem nežádoucích účinků [Harvey SC., 1985]. Řada studií prokázala jeho minimální nebo žádný vliv na mechaniku dýchání [Tepper RS. et al., 1986], funkci chemoreceptorů i vlastní dechový vzor [Lees MH. et al., 1982], [Hunt CE. et al., 1982], což ho činí zvláště vhodným pro sedaci v rámci iPFT. Určité diskuze byly vedeny ohledně poklesu saturace hemoglobinu kyslíkem jakožto nežádoucím účinku v důsledku deprese dechového centra. Ty byly zaznamenány v jedné práci [Mallol J., Sly PD., 1988] a to pouze u kojenců s doznívající obstrukční bronchitidou (u pacientů se stabilní CF zaznamenány nebyly). Z tohoto důvodu je vhodné při vyšetření iPFT monitorovat saturaci hemoglobinu kyslíkem a dbát zásady, že se iPFT provádí v klidovém stavu dítěte mimo akutní respirační infekci. U dětí starších 1,5 roku



může být efekt chloralhydrátu nedostatečný, v těchto případech jej s výhodou kombinujeme s midazolamem v dávce 0,1 – 0,3 mg/kg p. r. Na zahraničních pracovištích je další užívanou látkou triclofos sodný v dávkách 50 – 100 mg/kg. Ve své studii Jackson se spolupracovníky [Jackson EA. et al., 1991] prokázali výhodný profil účinku této látky na vitální funkce kojenců – po jeho podání nedochází k signifikantním změnám tepové frekvence ani poklesu saturací, byl zaregistrován pouze mírný vzestup dechové frekvence o 1,9/min (hodnocen jako statisticky signifikantní, avšak klinicky nevýznamný). Ostatní látky se sedativním účinkem (např. fenobarbital, propofol, ketamin) jsou využívány podstatně méně, jelikož mají výraznější efekt na dechové centrum než látky výše uvedené, a tedy i větší potenciál zkreslit výsledky funkčního vyšetření.

Vyšetření iPFT provádíme u dítěte ležícího v supinní poloze (obrázek 3.2.3.). Při interpretaci výsledků je nutné brát v úvahu efekt polohy těla na distribuci ventilace i perfúze, která je zásadně odlišná oproti poloze v sedě či ve stoje [Blair E., Hickam JB., 1955] – data od dospělých pacientů. Hlavička kojence by měla být umístěna v neutrální pozici či v lehkém záklonu tak, abychom zajistili maximální průchodnost horních cest dýchacích. Dále je třeba brát v úvahu vliv šíjových posturálních reflexů, kterými reaguje zejména novorozenec na změnu polohy hlavičky a které mohou komplikovat vyšetření (při snaze otočit hlavičku do neutrální polohy dojde k narušení spánku a reflexnímu pohybu končetin). Vzhledem ke skutečnosti, že během měření dýchá pacient skrz obličejovou masku, která obepíná nos i celá ústa, mají horní cesty dýchací podstatně větší vliv na výsledky vyšetření (zejména odpor dýchacích cest) než u dětí starších, které používají náustek. Zejména změny průchodnosti nosních meatů (např. v rámci akutního infektu horních cest dýchacích) mohou zásadním způsobem zkreslit výsledky vyšetření. Obdobně je tak třeba brát v úvahu i polohu jazyka. Neméně významné je umístění obličejové masky pro těsnost celého systému – sebemenší únik zásadním způsobem zkreslí výsledky měření. Obličejová maska samotná má ještě další důležité implikace. Bylo prokázáno, že kontakt masky s obličejem dráždí mechanoreceptory umístěné v oblasti úst a vyvolává reflex sací či pátrací. Dále byl prokázán i její vliv na dechový vzor [Dolfín T. et al., 1983]. Neméně podstatný je vliv mrtvého prostoru přístroje (nejen obličejové masky, ale i vlastního měřicího zařízení) na ventilační parametry dítěte. V obecné rovině lze konstatovat, že jeho zvýšení vede nejen k nárůstu minutové ventilace, ale i změně časování průběhu nádechu a výdechu. Z tohoto důvodu je snaha o jeho maximální snížení s cílovou hodnotou pod 2 ml/kg tělesné hmotnosti. Nejčastěji používaný typ masky je Rendel-Barker velikosti 0 – 4. K utěsnění se používá silikonová pasta, která při teplotě těla měkne a zajistí precizní kontakt s obličejem v plném rozsahu. Navíc vyplní část mrtvého

prostoru masky. Soubor hlavních doporučení pro technické aspekty při provádění iPFT byl uveřejněn Evropskou Respirační Společností (ERS) a Americkou Hrudní Společností (ATS) ve společném dokumentu [Bates JH. et al., 2000].



Obr. 3.2.3. Optimální poloha dítěte při vyšetření iPFT

Pro vlastní měření iPFT je potřeba dosáhnout klidového dechového vzoru se stabilní hodnotou objemu plic na konci výdechu (EEV – end expiratory level). Ačkoliv udržování EEV u kojenců (a zvláště pak novorozenců) je dynamický proces, stabilní EEV je nezbytným předpokladem pro správné odvození většiny významných ukazatelů funkce plic (zejména funkční reziduální kapacity). Dále je třeba získat dostatečně dlouhý a reprezentativní záznam měření, tak abychom dosáhli akceptovatelného koeficientu variability pro jednotlivé parametry (obvykle vyžadovány hodnoty pod 10 %). Ve výsledku je nutné vyšetření několikrát opakovat, takže v závislosti na počtu prováděných metod trvá iPFT 20 – 40 min (bez doby nutné k navození arteficiálního spánku).

Z výše uvedených požadavků na kvalitní měření vyplývá značná náročnost iPFT – jak časová, tak technická, nehledě na jeho vysokou cenu. Z tohoto důvodu je iPFT dostupné jen ve specializovaných centrech provádějících dostatečný počet měření tak, aby byla zajištěna adekvátní erudice personálu. V současné době není konsenzus na indikacích k vyšetření iPFT

a praxe se do značné míry liší mezi centry. Nicméně ERS, ATS a také ECFS (Evropská Společnost pro Cystickou Fibrózu) vyvíjejí řadu aktivit s cílem standardizovat iPFT a zajistit širší použití těchto metod v klinické praxi. Pro úplnost textu uvádím přehled nejběžnějších indikací iPFT – volně zpracováno dle [Godfrey S. et al., 2014], [Rosenfeld M. et al., 2013]:

1. diferenciální diagnostika nejasných respiračních příznaků (perzistující tachypnoe a dyspnoe, chronický kašel, nejasné stavy dušnosti, opakované obstrukční epizody) – jedná se o vyšetření druhé linie, které provádíme v situaci, kdy nebyla přínosná základní vyšetření jako RTG hrudníku, echokardiografie, atd. Zde je třeba vnímat nízkou specifitu iPFT – spíše než přesnou diagnózu stanoví okruh onemocnění, v kterém je třeba dále pátrat (např. restriktivní vzor postižení plicních funkcí směřuje k diagnóze intersticiálního plicního procesu, naopak obstrukční nález může svědčit pro obliterující bronchiolitidu, neuroendokrinní celulární hyperplasii kojenců (NEHI), bronchopulmonální dysplazii (BDP), cystickou fibrózu atp.);
2. stanovení tíže postižení dýchacího traktu a míry funkčního omezení – význam pro rozhodnutí o intenzitě léčby;
3. dlouhodobé sledování a eventuelní úprava léčby u chronického onemocnění (CF, BPD, vrozené vývojové vady – brániční kýla, hypoplazie plic apod.);
4. výzkumné účely – poskytuje informace o růstu, vývoji a fyziologii plic v nejtěleším věku, umožňuje objektivně hodnotit efektivitu léčebných intervencí.

### **3.2.1.2. Častěji používané metody iPFT v klinické praxi**

V současné době existuje řada vyšetřovacích metod iPFT, které jsou schopny hodnotit různé aspekty ventilační funkce plic – např. odpor dýchacích cest, nehomogenitu ventilace, mechanické vlastnosti celého dýchacího traktu či pouze jeho částí (plic, hrudní stěny), kvantifikovat jednotlivé plicní objemy a posoudit transfer plynů přes alveolokapilární membránu. Dále je možno provádět tato vyšetření po aplikaci různých podnětů s cílem posoudit reaktivitu dýchacího traktu (např. bronchodilatační a bronchoprovokační testy). Do klinické praxe však pronikla pouze část z těchto metod. Limitujícími faktory, krom výše zmíněné technické a časové náročnosti vyšetření, je i nedostupnost komerčně vyráběných přístrojů určených k rutinnímu použití. Výrobci totiž nejsou motivováni vyvinout přístroj jen pro několik málo specializovaných center. Na to navazuje i nedostatečná standardizace metodiky těchto méně běžných vyšetření a absence norem (referenčních hodnot zdravé populace). V dalším textu se proto budu zabývat pěti (šesti) vybranými metodami, které

rutinně provádíme ve funkční laboratoři Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol, a které již byly dostatečně standardizovány a existují pro ně referenční normy.

#### *A. Dětská bodypletysmografie*

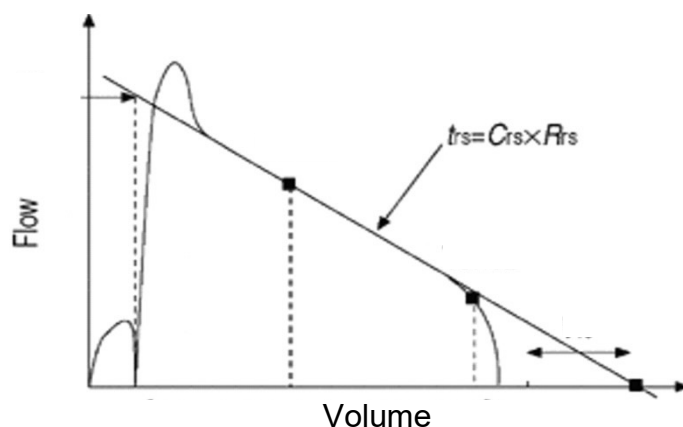
Bodypletysmografické vyšetření u kojenců je založeno na stejných principech jako u dospělých a spolupracujících dětí. Vychází z Boyleova-Mariottova zákona o tlaku plynů, který říká, že za izotermických podmínek je součin tlaku a objemu ideálního plynu konstantní. Vyšetření probíhá v uzavřeném boxu se známou časovou konstantou za klidového dýchání. V první fázi se měří specifický odpor dýchacích cest ( $sR_{aw}$ ) – tedy odpor dýchacích cest vztažený k objemu plic, při kterém je měřen. V druhé fázi dochází na konci nádechu (odlišnost od dětí spolupracujících) k uzavěru dýchacích cest a několika pokusům o výdech a následný nádech proti odporu uzavřené záklopky. V rámci toho dochází ke stlačení resp. rozepnutí veškerého vzduchu v hrudníku potažmo k opačným změnám tlaku v uzavřeném boxu. Při známém objemu boxu, tlaku v alveolech (který je extrapolován tlakem v ústech při uzavěru záklopky a nulovém průtoku) a tlaku v boxu včetně jejich změn při pokusu o dýchání proti uzavřené záklopce je možné spočítat hodnotu  $FRC_{box}$  (přesněji objem veškerého vzduchu v hrudníku – ITGV, intrathoracic gas volume).

Toto vyšetření patří mezi nejstarší metody (pochází z 50. let 20. století), v současné době je k dispozici komerčně dostupný přístroj a řada materiálů zabývajících se standardizací této metody [Stocks J. et al., 2001], [Hulskamp G. et al., 2006]. K dispozici jsou i relativně robustní normy pro pletysmografickou hodnotu FRC [Nguyen TT. et al., 2013], [Hulskamp G. et al., 2003]. Problematictější situace je u norem pro odpor dýchacích cest, kde není jednotný přístup ke způsobu jeho vyjadřování (např. efektivní vs. celkový odpor dýchacích cest). Poukazuje se též na značnou variabilitu tohoto parametru a řadu technických faktorů, které měření mohou zkreslit [Subbarao P. et al., 2005]. V naší laboratoři se osvědčilo použití izraelských norem [Godfrey S. et al., 2009].

#### *B. Měření pružných vlastností dýchacího traktu – pasivní mechanika měřená okluzními technikami*

Základními parametry mechanických vlastností dýchacího traktu je jeho poddajnost ( $C_{rs}$ ), odpor ( $R_{rs}$ ) a časová konstanta ( $\tau_{rs}$ ). Poddajnost je definována jako změna objemu způsobená změnou tlaku. V případě  $C_{rs}$  se jedná o změnu objemu dýchacího traktu při výdechu dělenou změnou transtorakálního tlaku (tzn. rozdílem mezi tlakem atmosférickým a tlakem v alveolech). Časová konstanta dýchacího traktu je definována jako doba, za kterou

objem plic při pasivním výdechu klesne o 63 % (obrázek 3.2.4.). Odpor dýchacího traktu je pak dopočítán ze známé časové konstanty a poddajnosti ( $R_{rs}$  je podíl časové konstanty a poddajnosti dýchacího traktu). Pro měření pasivní mechaniky dýchacího traktu pomocí okluzních technik je základním předpokladem vyrovnání tlaku v alveolech s tlakem v dutině ústní v okamžiku uzávěru dýchacích cest (resp. záklopky v pneumotachografu). To umožní extrapolovat tlak vzduchu v alveolech. K tomuto vyrovnání tlaků dochází u zdravého jedince během zlomku sekundy, naopak u pacienta s významnou obstrukcí dýchacích cest až s určitým zpožděním, což může zkreslovat výsledek měření. Existuje několik modifikací měření pružných vlastností dýchacího traktu pomocí okluzních technik – víceuzávěrová metoda, kdy k uzávěru dýchacích cest dochází v průběhu celého výdechu na různých objemových úrovních, což umožní zkonstruovat deflační křivku tlak-objem (PV), a dále pak metoda jedno- a dvou okluzí, které využívají Hering-Breuerova inflačního reflexu. Tento reflex má za cíl zabránit nadměrné distenzi dýchacího traktu při nádechu a vede k inhibici nádechových neuronů dechového centra a následnému pasivnímu výdechu ovlivněnému pouze mechanikou dýchacího traktu (nádechové svaly jsou reflexně inhibovány). To umožní změřit  $C_{rs}$  i  $\tau_{rs}$ . Hering-Breuerův reflex lze vyvolat u kojenců krátkým uzávěrem dýchacích cest ke konci nádechu, snadnost jeho vybuzení klesá s věkem a narůstající dechovou frekvencí.



Obr. 3.2.4. Znázornění závislosti průtoku na objemu během pasivního výdechu (Hering-Breuerův inflační reflex) při měření poddajnosti a odporu dýchacího traktu jednookluzní technikou.<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Na vodorovné ose je objem (Volume), na svislé ose průtok (Flow). Lineární část křivky je proložena přímkou, jejíž sklon odpovídá časové konstantě dýchacího traktu (zde  $\tau_{rs}$ , odpovídá  $\tau_{rs}$  v textu) a která je součinem poddajnosti ( $C_{rs}$ ) a odporu ( $R_{rs}$ ). Na počátku výdechu jsou patrné artefakty průtoku způsobené otevřením záklopků dýchacích cest. Upraveno podle: Gappa M. et al., 2001.

Metodika tohoto vyšetření je opět dostatečně standardizovaná [Gappa M. et al., 2001], [Gappa M. et al., 2006], k dispozici jsou normy [Nguyen TT. et al., 2013], [Katier N. et al., 2006], [Hanrahan JP. et al. 1996] i komerčně dodávaný přístroj.

### *C. Analýza klidového dechového vzoru*

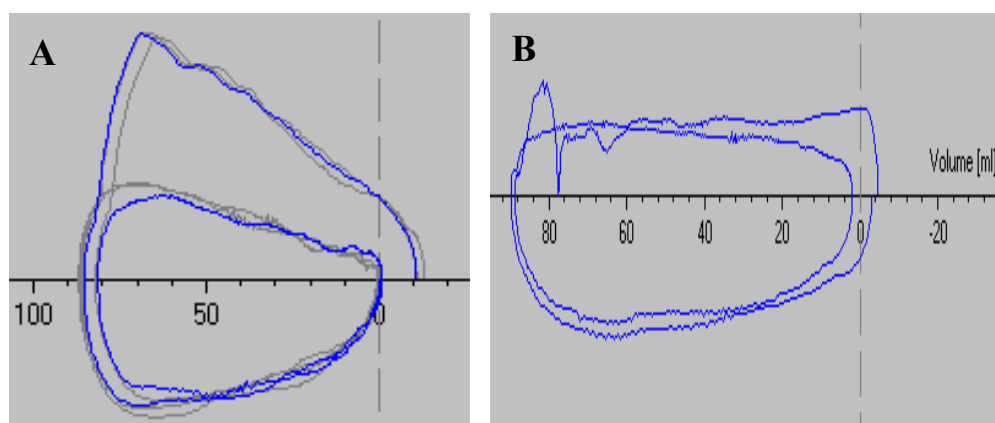
Analýza klidového dechového vzoru představuje velmi jednoduché vyšetření, během kterého měříme pouze průtok v čase (z něhož pak integrací získáme objem). Na rozdíl od dříve zmíněných metod tedy nemusíme měřit tlak či provádět uzávěr dýchacích cest. Základními parametry, které lze z tohoto vyšetření získat, jsou dechová frekvence (RR), dechový objem ( $V_t$ ), minutová ventilace (VE), poměr doby nádechu ku výdechu ( $t_I/t_E$ ), poměr času do dosažení maximálního výdechového průtoku ku času výdechu ( $t_{PTEF}/t_E$ ) a další parametry charakterizující klidovou křivku průtok-objem (FV křivka). Velmi zajímavý je parametr  $t_{PTEF}/t_E$ , který se v několika populačních studiích ukázal jako prediktor pozdější respirační morbidity ve vztahu k asthma bronchiale resp. obstrukčním epizodám [Martinez FD. et al., 1988], [Håland G. et al., 2006].

V současné době je metodika tohoto vyšetření dobře standardizovaná [Baldwin DN. et al., 2006], [Bates JH. et al., 2000] a k dispozici jsou i normy pro většinu používaných parametrů [Ranganathan SC. et al., 2003]. Ačkoliv výstupní parametry z tohoto vyšetření mají poměrně malou senzitivitu i specifitu pro jednotlivé plicní patologie, v naší praxi se osvědčilo ho zařadit do vyšetřovacího programu – již vzhledem k jednoduchosti, časové nenáročnosti a možnosti provést tuto analýzu i v rámci jiných vyšetření. Za zmínku stojí i možnost provedení tohoto vyšetření za různých vnějších podmínek (např. hyperoxie nebo naopak hypoxie), což umožňuje studium ventilační odpovědi kojence na tyto podněty a tím i vyšetření funkce chemoreceptorů [Cross KW., Warner P., 1951], [Dejours P., 1962], [Bouferrache B. et al., 2000], [Bouferrache B. et al., 2002].

### *D. Rychlá torakoabdominální komprese (měření usilovných výdechových průtoků)*

Měření usilovných průtoků u kojenců představuje určitou alternativu k základnímu vyšetření ventilační funkce plic starších pacientů – spirometrii. V rámci tohoto vyšetření je posuzována především průchodnost periferních dýchacích cest. Cílem je dosáhnout tzv. průtokové limitace, kdy další navyšování expiračních tlaků již nevede k nárůstu průtoku dýchacími cestami. Vzhledem k „nespolupráci“ kojenců nelze výdechové tlaky navyšovat volně – tedy aktivitou dýchacích svalů, místo toho používáme zevní stlačení hrudníku a břicha (torakoabdominální komprese). To se děje nafouknutím vestičky obepínající hrudník a

bříško na tlaky 3 – 20 kPa. Existují dvě základní modifikace tohoto vyšetření. V první variantě (tzv. tidal breath rapid thoracoabdominal compression – TV-RTC) dochází ke stlačení na konci klidového nádechu. Výstupem je parciální usilovná křivka průtok-objem, ze které stanovujeme parametr  $V'_{\max}$  FRC čili maximální průtok na úrovni funkční reziduální kapacity. Dále pak posuzujeme tvar křivky a relativní nárůst výdechových průtoků mezi klidovým výdechem a forsírovaným výdechem (ventilační rezerva) – obrázek 3.2.5. Druhá varianta vyšetření je poněkud sofistikovanější, usilovný výdech provádíme na konci maximálního nádechu, čili z hladiny TLC (celková plicní kapacita). Úrovně TLC dosahujeme aktivním nafouknutím plic, kdy v průběhu vlastního nádechu pacienta je do dýchacích cest aplikován přetlak (bezpečná hodnota 30 cm vodního sloupce), teprve potom dochází k forsírovanému výdechu pomocí nafouknuté vestičky. Tato modifikace se nazývá RV-RTC (raised volume rapid thoracoabdominal compression) a je prakticky identická se standardní spirometrií. Výstupními parametry jsou usilovná vitální kapacita (FVC), objem vzduchu vydechnutý během usilovného výdechu za 0,5 resp. 0,75 s ( $FEV_{0,5}$  resp.  $FEV_{0,75}$ ) a dále pak maximální průtoky na hladině 15, 25, 50, 75 a 85 % vitální kapacity ( $MEF_{15}$ ,  $MEF_{25}$ ,  $MEF_{50}$ ,  $MEF_{75}$ ,  $MEF_{85}$ ). Ty odpovídají parametrům  $FEF_{85, 75, 50, 25}$  a 15 ve stejném pořadí – tzn. po vydechnutí daného procenta vitální kapacity. Pokud zkombinujeme vyšetření RV-RTC s bodypletysmografií (stanovení FRC) a měřením expiračního rezervního objemu (ERV) je možné dopočítat další plicní kapacity a objemy plic (TLC, RV, IC, IRV...).



Obr. 3.2.5. Parciální usilovná FV křivka jako výstup metody TV-RTC u pacienta (A) bez obstrukce periferních dýchacích cest a (B) s významnou obstrukcí periferních dýchacích cest a klidovou průtokovou limitací.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Na vodorovné ose je znázorněn objem v mililitrech, na svislé ose průtok (kladné hodnoty – výdech, záporné nádech). Objemová úroveň „0“ odpovídá za ideálních podmínek objemové hladině funkční reziduální kapacity.

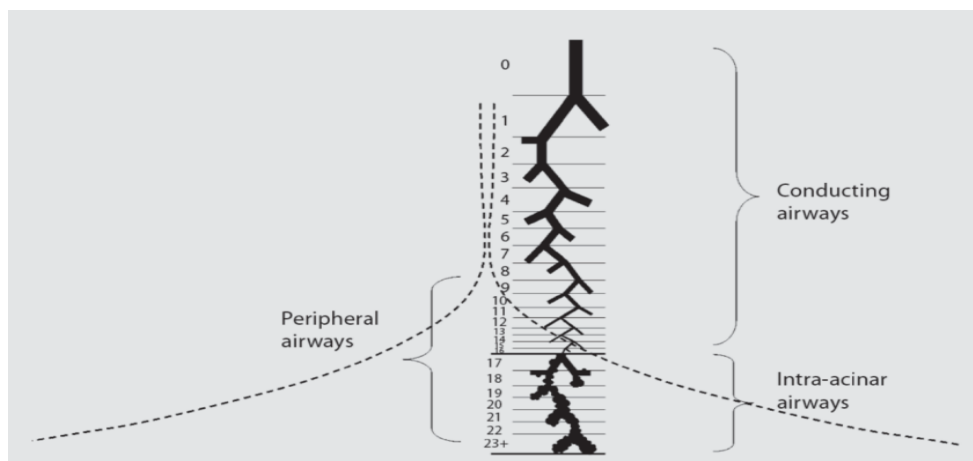
Data z řady studií ukazují vysokou senzitivitu metody usilovného výdechu při detekci obstrukce periferních dýchacích cest, přičemž bylo prokázáno, že metoda RV-RTC je citlivější než TV-RTC [Turner DJ. et al., 1994]. Metodika těchto měření je plně standardizovaná [Lum S. et al., 2006], [The Joint American Thoracic Society/European Respiratory Society Working Group on Infant Lung Function, 2000], [Sly PD. et al., 2000] a jsou k dispozici normy [Jones M. et al., 2000], [Castile R. et al., 2000], [von Ungern-Sternberg BS. et al., 2009], [Hoo AF. et al., 2002]. Metoda RV-RTC patří mezi nejčastěji studované a doporučované modality iPFT, znám je i její prediktivní potenciál pro budoucí respirační morbiditu u vybraných chronických respiračních onemocnění [Turner SW. et al., 2004], [Martinez FD. et al., 1995].

#### *E. Test vícedechového vyplavování inertního plynu z plic*

Test vícedechového vyplavování inertního plynu z plic (MBW) představuje v klinické praxi relativně nově zavedenou vyšetřovací metodu. Principiálně je MBW založen na hodnocení intrapulmonálního míšení plynů, respektive hodnocení nehomogenity ventilace plic. Tím se liší od klasických metod (např. spirometrie či bodyplety-smografie), které jsou založeny na hodnocení odporu dýchacích a které informují především o průchodnosti větších dýchacích cest. Naopak nejperifernější dýchací cesty (12. a další generace bronchiálního větvení) přispívají k celkovému odporu dýchacích cest relativně málo. To je dáno skutečností, že odpor trubice závisí nepřímo úměrně na čtvrté mocnině jejího poloměru, a dále tím, že celkový průřez dýchacích cest směrem do periferie stoupá (teorie Weibelovy trumpetky [Weibel ER., Morphometry of the Human Lung, New York Academic Press, 1963, ISBN 978-3-642-87553-3]) – obrázek 3.2.6. Test vícedechového vyplavování inertního plynu z plic je tedy principiálně odlišný od dříve zmíněných metod a v důsledku toho má i větší senzitivitu k postižení nejperifernějších dýchacích cest. U řady chronických onemocnění respiračního traktu je známo, že první stádia choroby postihují především tyto nejmenší průdušky. Z tohoto důvodu mohou být klasické metody vyšetření plic nedostatečné k odhalení počínajících patologických procesů. U starších pacientů s asthma bronchiale bylo zjištěno, že i přes dobrou kompenzaci a normální spirometrii může být u významné části dětí přítomna reziduální porucha funkce nejperifernějších dýchacích cest, která svědčí o stále aktivním zánětu [Macleod KA. et al., 2009]. Řízení léčby na základě takto senzitivního parametru pak má potenciál k lepšímu nastavení dlouhodobé udržovací léčby. Při progresi nehomogenity ventilace u ještě asymptomatického jedince by bylo možno odhalit hrozící exacerbaci ještě před zhoršením klinického stavu, samozřejmě za předpokladu dostatečně frekventních



kontrol. Vzhledem k stávající časové a technické náročnosti vyšetření MBW je toto v současné době proveditelné jen u přísně selektovaných pacientů. U kojenců s CF se MBW osvědčilo též při detekci časných stádií plicního postižení. Např. Hoo se svými spolupracovníky ukázal, že porucha funkce plic může být přítomna již u kojenců ve věku kolem 3 měsíců, kteří zatím ani neprodělali žádnou akutní exacerbaci [Hoo AF. et al., 2012]. Obdobně Belessis se spolupracovníky ve své studii z roku 2012 [Belessis Y. et al., 2012] došel k závěru, že u pacientů s CF je LCI (očišťovací index plic) jakožto hlavní výstupní parametr z MBW citlivý a neinvazivní marker časného postižení plic s vysokou opakovatelností měření. Bylo též prokázáno, že metoda MBW je komplementární k RV-RTC [Hoo AF. et al., 2012], [Lum S. et al., 2007] a HRCT hrudníku [Owens CM. et al., 2011] co do schopnosti detekovat časná stadia plicního postižení. Každé z těchto vyšetření je schopno diagnostikovat jiný typ plicního postižení.



Obr. 3.2.6. Rozšiřující se celkový průsvit dýchacích cest směrem do periferie (teorie Weibelovy trumpetky).

Převzato z: Weibel ER., *Morphometry of the Human Lung*, New York Academic Press, 1963, ISBN 978-3-642-87553-3

Test vícedechového vyplavování inertního plynu z plic probíhá během klidového dýchání, jedinou podmínkou pro akceptovatelné měření je dostatečně dlouhý úsek pravidelného dýchání bez jakýchkoliv známek netěsnosti. Hlavními výstupními parametry jsou funkční reziduální kapacita stanovená dilučním způsobem ( $FRC_{dil}$ ) a očišťovací index plic (LCI) jakožto index globální nehomogenity ventilace. Dále existuje i několik parametrů regionální nehomogenity ventilace plic, které však uplatnění v klinické praxi zatím nenacházejí – parametry Scond (index nehomogenity konduktivního oddílu dýchacího traktu) a Sacin (index nehomogenity acinárního oddílu dýchacího traktu). MBW existuje v několika

modifikacích podle použitého inertního plynu. Pro kojence je dosud doporučována varianta vyplavování hexafluoridu síry ( $\text{SF}_6$ -MBW). Zde se jedná o tzv. exogenní inertní plyn, který se nejprve musí do plic dostat – to se děje v průběhu wash-in fáze. Během ní pacient dýchá směs vzduchu a  $\text{SF}_6$  (většinou v koncentraci 4 %, nicméně existují i přístroje schopné používat koncentrace i o řád nižší). Poté, co dojde k nasycení plic inertním plynem (tzn. koncentrace  $\text{SF}_6$  ve vydechovaném vzduchu bude odpovídat koncentraci v nadechovaném vzduchu), je zahájena wash-out fáze, během níž dochází k „vymývání“  $\text{SF}_6$  z plic, čili k pozvolnému poklesu jeho koncentrace ve vydechovaném vzduchu. Celý test je ukončen v okamžiku, kdy koncentrace  $\text{SF}_6$  klesne pod 1/40 (2,5 %) koncentrace původní (tato hodnota byla stanovena arbitrárně na základě citlivosti původních čidel měřící koncentraci inertního plynu). Druhou modifikací MBW je tzv. dusíkový washout. Zde používáme endogenní plyn, který je v plicích běžně přítomen ( $\text{N}_2$ ). U něj není nutné provádět wash-in fázi, hned zahajujeme vymývání dusíku z plic pomocí 100% kyslíku. Test ukončujeme též při poklesu koncentrace dusíku pod 2,5 % koncentrace původní. Podrobněji byla metodika MBW v české literatuře popsána v přehledovém článku autora [Koucký V., Pohunek P., 2016].

Technika vyšetření byla popsána v několika mezinárodních doporučeních [Robinson PD. et al., 2013], [Pillow JJ. et al., 2006]. K dispozici je též standardní postup od firmy Ecomedics pro jejich přístroj Exhalyzer D [Jensen R. et al., 2013]. Pro kojenecký věk jsou k dispozici normy zatím pouze pro hexafluoridový washout [Lum S. et al., 2013]. Využití metody  $\text{N}_2$ -MBW v kojeneckém věku je některými autory zpochybňováno, jelikož existují různé fyziologické aspekty, které mohou měření nehomogenity ventilace tímto způsobem zkreslit. Dýchání 100% kyslíku během wash-out fáze mění dechový vzor (viz ventilační odpověď na hyperoxii popsána dále). Během wash-out fáze také může docházet ke zpětné difuzi dusíku z krve a tkání do plic (dusík není 100% inertní plyn a je částečně rozpuštěn v krvi). Navíc mohou technické aspekty nepřímého stanovení koncentrace dusíku ve vydechovaném vzduchu negativně ovlivnit přesnost měření [Sullivan L. et al., 2017], [Gustafsson PM. et al., 2017]. Možnostmi využití  $\text{N}_2$ -MBW v rámci funkčního vyšetření kojenců se budu podrobněji zabývat v praktické části práce, jelikož má tato metodika řadu výhod oproti  $\text{SF}_6$ -MBW a její klinický potenciál nebyl dosud plně ozřejměn.

Závěrem kapitoly o plicní funkční diagnostice nespolupracujících dětí konstatuji, že metody iPFT umožňují v rámci výzkumu detailně charakterizovat patofyziologické změny dýchání u nespolupracujících dětí s chronickým plicním postižením. Ačkoliv tyto metody ještě plně nepronikly do běžné klinické praxe, již nyní mohou ve vybraných případech přispět

jak k diagnostice, tak i k léčebnému postupu u těchto dětí a představují tak zajímavé rozšíření diagnostického spektra pro časné patofyziologické změny dýchání malých dětí s chronickým respiračním onemocněním.

### 3.2.2. Vyšetření respirace

Cílem vyšetření respirační funkce plic je zhodnotit výměnu dýchacích plynů mezi alveoly a krví. V úzké vazbě na perfúzi je tedy hodnocena dodávka  $O_2$  do tkání a odstranění  $CO_2$  z tkání. Transport kyslíku krví se odehrává z hlavní části ve vazbě na hemoglobin, pouze minimální část je transportována rozpuštěná v plazmě. Celkové množství kyslíku dodaného do tkání lze spočítat podle vztahu:

$$V_{O_2} = SV \times [(Hb \times SpO_2 \times 1,39) + (0,0031 \times p_aO_2)],$$

kde  $V_{O_2}$  značí množství kyslíku dodaného do tkání za minutu,  $SV$  minutový srdeční výdej,  $Hb$  koncentraci hemoglobinu v krvi,  $SpO_2$  saturaci hemoglobinu kyslíkem,  $p_aO_2$  parciální tlak kyslíku v krvi, číslo 1,39 představuje konstantu (vazebná kapacita hemoglobinu pro kyslík) a 0,0031 koeficient rozpustnosti kyslíku v krvi.

V případě transportu oxidu uhličitého z tkání do plic je situace poněkud složitější, kdy část  $CO_2$  je rozpuštěna, část je transportována v podobě hydrogenuhličitanového iontu ( $HCO_3^-$ ) a část ve vazbě na bílkoviny (karbamáty). Transport se odehrává jak v krevní plazmě, tak v erytrocytech. Hlavním faktorem ovlivňujícím množství  $CO_2$  v krvi je jeho parciální tlak. V klinické praxi tedy vyšetřujeme především saturaci hemoglobinu kyslíkem a parciální tlaky dýchacích plynů.

Mezi hlavní klinicky používané metody vyšetření respirační funkce dýchacího traktu patří:

1. Pulzní oxymetrie – představuje screeningové vyšetření respirace. Jedná se o neinvazivní metodu, která hodnotí saturaci hemoglobinu kyslíkem. Při interpretaci je nutné brát v úvahu faktory, které mohou výsledky zkreslit – stupeň prokrvení místa měření, pigmentace kůže, hemoglobinopatie a další. Dále je nutné brát v úvahu disociační křivku hemoglobinu, kdy její posun vlivem změn pH, teploty a dalších parametrů může zásadním způsobem ovlivnit množství kyslíku v krvi navzdory nezměněné saturaci.
2. Transkutánní měření parciálního tlaku kyslíku ( $O_2$ ) a oxidu uhličitého ( $CO_2$ ) – jedná se též o neinvazivní vyšetření, které je založeno na difuzi dýchacích plynů přes kůži. Jelikož pro dostatečně přesné měření je třeba zajistit dobré prokrvení kůže a najít

místo s dostatečně tenkou kůží, má tato metoda využití hlavně u dětských pacientů (např. neonatologická JIP). Limitující pro tuto metodu stále zůstává přesnost snímačů.

3. Měření koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého ve vydechovaném vzduchu – opět neinvazivní metoda, která umožňuje stanovit spotřebu  $O_2$  a produkci  $CO_2$ . Na základě jejich znalostí pak lze vypočítat i respirační koeficient.
4. Měření parciálního tlaku kyslíku a oxidu uhličitého v kapilární a arteriální krvi – invazivní vyšetření, které však v současné době představuje zlatý standard pro vyšetření respirační funkce plic. Umožňuje přesně kvantifikovat stupeň hypoxemie a hyperkapnie, na základě těchto informací pak lze posoudit typ respirační insuficience (I. a II. typ respirační insuficience resp. selhání plicního parenchymu a selhání ventilační pumpy).

### **3.3. Detekce strukturálních změn dýchacího traktu**

Strukturální změny a možnosti jejich detekce představují sice vedlejší tematiku předkládané dizertační práce, nicméně vzhledem k těsné souvislosti strukturálních a funkčních změn je tato problematika též zmíněna. V návaznosti na to jsou pak uvedeny i naše výsledky zabývající se vztahem poruchy funkce plic a morfologických změn v rámci remodelace dýchacích cest.

#### **3.3.1 Mikroskopické změny**

Mikroskopické strukturální změny na úrovni buněk a tkání, tak jak byly zmíněny v kapitole 2.2., lze zkoumat v bioptických vzorcích. V současné době existuje řada přístupů k získání biologického materiálu odlišujících se svojí invazivitou. Endobronchiální biopsie (EBB) představuje minimálně invazivní proceduru, jejíž bezpečnost byla prokázána v řadě studií [Bush A., Pohunek P., 2000], [Payne D. et al., 2001] atd. Poskytuje vzorek tkáně z povrchových struktur bronchiální stěny (epitel, bazální membrána, slizniční a podslizniční vazivo včetně žlázek a cév, případně i snopce hladké svaloviny a části chrupavky). Je indikována u fokálních intraluminálních procesů (nádory, granulace atd.) a dále pak u difuzních procesů postihujících stěnu průdušek (bronchiální astma, cystická fibróza, primární ciliární dyskineze a další). Ačkoliv klinický význam EBB je některými autory zpochybňován, pro výzkumné účely se jedná o nezastupitelnou metodu a panuje konsenzus, že u klinicky indikované biopsie je eticky přípustné využít část vzorku i pro vědecké účely [De Blic J. et

al., 2002]. Transbronchiální biopsie (TBB) jakožto invazivnější přístup poskytuje informace o plicním parenchymu, ve vzorcích lze zachytit drobné cévky, alveoly v počtu desítek až stovek a interalveolární septa. Je indikována u difuzních procesů postihujících plicní parenchym (např. sarkoidóza či exogenní alergická alveolitida). Nezastupitelnou roli má u transplantovaných pacientů v detekci rejekce štěpu. Vzhledem k vyšší invazivitě je nutno počítat i s více, resp. závažnějšími komplikacemi než v případě EBB. Jedná se zejména o krvácení a pneumotorax. Nověji je do praxe zaváděna technika TBB s využitím kryosondy. Metoda má potenciál poskytnout větší a reprezentativnější vzorek parenchymu, avšak u pediatrických pacientů zatím není dostatek dat o bezpečnosti výkonu a její klinické výtečnosti. Nejrozsáhlejší vzorek plicního parenchymu poskytne otevřená plicní biopsie (v současné době získaná většinou pomocí video-asistované torakoskopie či z minitorakotomie), v rámci které lze hodnotit všechny části plic. Zásadní je správné zacílení odběru do postižených míst (tzn. s největší pravděpodobností výskytu patologických změn). Zde se řídíme většinou nálezem na CT hrudníku a optimálně volíme alespoň dvě různá místa. Nevýhodou otevřené plicní biopsie je především její invazivita s relativně dlouhou dobou rekonvalescence a nezanedbatelné riziko komplikací.

Získaný vzorek plicní tkáně je nutno bezprostředně po odběru fixovat – pro světelnou mikroskopii používáme zpravidla formaldehyd, pro elektronovou pak glutaraldehyd. Následuje řetězec laboratorních postupů, které ve výsledku poskytnou tenké řezy tkání vhodné k pozorování ve světelném (event. při odpovídající technice zpracování i v elektronovém) mikroskopu. Pro pozorování vzorku pomocí světelného mikroskopu je nutno vzorek nabarvit tak, aby se zvýšil kontrast jednotlivých tkáňových struktur. Základem jsou přehledná barvení – např. hematoxylin-eozin. Ke specifickému průkazu dalších strukturálních komponent dýchacího traktu či konkrétních buněk lze využít specifická barvení – např. PAS (Periodic Acid Schiff Agens) pro průkaz glykogenu či mucinů, barvení trichromy (průkaz vazivových struktur) atd. Dále existují náročnější techniky jako např. impregnace stříbrem pro průkaz retikulárních vláken či metody imunohistochemické, které na podkladě vazby antigen-protilátka umožňují detekci prakticky jakéhokoliv strukturálního proteinu, resp. antigenní struktury. Typickým využitím imunohistochemie je průkaz strukturálních proteinů bazální membrány a nepřímou i vizualizace jejich podvrstev (lamina basalis a lamina reticularis). Tento přístup má však jen malý dosah do klinické praxe, o to významnější je jeho výzkumné využití, které lze provádět paralelně s klinickým hodnocením. Krom kvalitativního hodnocení bioptických vzorků (přítomnost jednotlivých strukturálních komponent), lze některé z nich i kvantifikovat (s výhodou za pomoci digitálního zpracování obrazu). Velmi dobře je tento

přístup standardizován v případě bazální membrány [Payne DN. et al., 2003], [Sullivan P. et al., 1998] či hladké svaloviny. Nově je do diagnostického spektra zařazena i metoda imunofluorescence, která též umožňuje průkaz jednotlivých strukturálních proteinů s vysokou senzitivitou i specificitou (viz využití v rámci diagnostiky primární ciliární dyskineze). V případě elektronové mikroskopie používáme především transmisní techniku. Ačkoliv je tato metoda velmi náročná a dostupná jen ve specializovaných centrech, má svoji roli i v klinické praxi – diagnostika primární ciliární dyskineze a průkaz absence různých struktur axonematu řasinky.

Možností pro hodnocení funkčních změn na úrovni buněk a tkání je v současné době mnohem méně. Nicméně dvě klinické oblasti, kde tyto metody nacházejí významnější uplatnění, představují primární ciliární dyskineze a cystická fibróza. V rámci diagnostického protokolu primární ciliární dyskineze má zásadní roli vysokorychlostní videomikroskopie (HSVM – High Speed VideoMicroscopy). Tato metoda umožňuje hodnotit frekvenci i charakter pohybu řasinek, konstatovat jejich akinezi či dyskinezi a v typických případech i vyjádřit podezření na konkrétní strukturální defekt. Zásadní limitací této metody však zůstává rozlišení primárních (geneticky podmíněných) a sekundárních (vzniklých např. na podkladě infekce) změn. To může řešit hodnocení HSVM u sekundární generace buněk získaných z buněčné kultury. Průkaz funkčních změn na úrovni buněk a tkání u cystické fibrózy je též využíván diagnosticky. Samotné vyšetření koncentrace chloridových aniontů v potu představuje nepřímé hodnocení funkce CFTR proteinu. Novější metody pro vyšetření funkce CFTR kanálu případně i dalších transportních proteinů zahrnují vyšetření transepiteliálního rozdílu potenciálů na nosní sliznici (NPD – Nasal Potential Difference) [Schüler D. et al., 2004], [Taylor CJ. et al., 2009], [Wilschanski M. et al., 2001] a metody intestinálních organoidů [Berkers G. et al., 2019], [De Boeck K. et al., 2011]. Obě tyto metody umožňují hodnotit transepiteliální pohyb iontů, v případě nosních potenciálů in vivo (nosní sliznice), v případě intestinálních organoidů na in vitro vytvořených epiteliálních strukturách. Tyto metody lze použít v diagnostice atypických forem cystické fibrózy či v rámci průkazu efektu léčiv cílených na dysfunkci CFTR proteinu (personalizovaná léčba). Do budoucna lze předpokládat další rozvoj těchto technik a jejich širší uplatnění v klinické praxi.

### **3.3.2. Makroskopické změny**

Makroskopické strukturální změny byly popsány v kapitole 2.3.2. V současné době je jejich detekce běžnou součástí klinické praxe a má klíčovou úlohu v diagnostice a monitoraci

průběhu řady chronických respiračních onemocnění. K jejich detekci jsou používány různé modalities zobrazovacích technik vesměs využívajících radiační záření. Nejčastěji se jedná o rentgenový snímek hrudníku (skiografie), různé skiaskopické techniky a výpočetní tomografii (CT). Další metodou zaměřenou především na patologii pleury je pak ultrazvukové vyšetření. Nově je do plicní diagnostiky zaváděna též magnetická resonance hrudníku [Puderbach M. et al., 2007], [Eibel R. et al., 2006]. Její nesporná výhoda oproti výpočetní tomografii spočívá v absenci radiačního záření, přičemž některé práce prokazují i její srovnatelnou sensitivitu a specifitu k vybraným plicním patologiím jako má CT plic. K definitivnímu posouzení významu MR v klinické praxi je však třeba dalších studií.

Prostý rentgenový snímek hrudníku (skiagram hrudníku) je prvním a základním zobrazovacím vyšetřením v pneumologii. Ačkoliv je jeho senzitivita ke změnám vyskytujícím se v časných stádiích chronického respiračního onemocnění nízká, význam má především k vyloučení hrubších abnormit. Další výhodou je i velmi nízká dávka ionizujícího záření, které je pacient při vyšetření vystaven. Vzhledem k dlouhé době používání této metody u chronických respiračních onemocnění byl její klinický přínos extenzivně hodnocen a na základě těchto informací pak vypracovány různé skórovací systémy kvalitativních i kvantitativních změn u různých chronických respiračních onemocnění. Typickým příkladem je cystická fibróza – např. Brasfieldovo [Brasfield D. et al., 1979] či Schwachman-Kulczyckého skóre [Shwachman H. et al., 1958].

Současným zlatým standardem zobrazovacích technik u pacientů s chronickým respiračním onemocněním je helikální multidetektorová výpočetní tomografie (CT). Toto vyšetření má oproti prostému skiagramu hrudníku větší rozlišovací schopnost a poskytuje lepší prostorovou informaci (jedná se o zobrazení určité vrstvy hrudníku oproti sumaci v případě RTG snímku). Na druhou stranu je nutno počítat s vyšší radiační zátěží (zhruba 2 – 8 mSv, tzn. o cca 2 řády více než zadopřední skiagram hrudníku). Tuto zátěž je však možno v určitých klinických situacích významně snížit tzv. low-dose protokolem (radiační zátěž zhruba 0,2 – 0,5 mSv). Podle klinické indikace existuje řada modifikací CT vyšetření. Vyšetření v módu high resolution (HRCT – CT s vysokým rozlišením) je cíleno především na plicní intersticiu a hodí se k zobrazení difuzních plicních procesů – např. intersticiálních plicních procesů, dále je suverénní metodou pro přesné zobrazení bronchiectazií. Naopak k hodnocení plicních nodulů a expanzivních procesů jak v mediastinu, tak v plíci je výhodnější helikální CT s iterativní rekonstrukcí. Jeho výpovědní hodnota může být dále zvýšena aplikací kontrastní látky, což umožní přesněji diferencovat struktury mediastina a hodnotit stupeň vaskularizace dané struktury. V případě CT angiografie jsou pak dle načasování

podání kontrastní látky a CT vyšetření přesně rekonstruovány jednotlivé cévní struktury hrudníku (tepny, resp. žíly). Konkrétní klinické indikace k provedení CT hrudníku jsou velmi široké a zahrnují vrozené anomálie dýchacích cest i cévních struktur, patologie cév (aneurysmata, vaskulitidy), expanzivní procesy mediastina, intersticiální plicní onemocnění (difúzní onemocnění plicního parenchymu – DLPD), ložiskové plicní postižení, cystickou fibrózu a další formy chronické bronchitidy. Obdobně jako v případě RTG snímku byly i pro metodu CT vyvinuty různé skórovací systémy (semi-) kvantitativně hodnotící strukturální změny spojené s daným onemocněním – např. Brodyho skóre pro CF [Brody AS. et al., 2006] a další [Calder AD. et al., 2014]. Výpočetní tomografie hrudníku tedy v současné době patří mezi nejvýznamnější diagnostické metody v pneumologii.

### **3.4. Shrnutí teoretické části práce**

V současné době je k dispozici velké množství informací o funkčních a morfologických změnách dýchacího traktu u dětí v časných stádiích chronického plicního onemocnění. Ačkoliv jsou tyto odchylky již relativně podrobně popsány, v klinické praxi zatím není k dispozici ustálený diagnostický algoritmus, který by umožňoval jejich dostatečně citlivou a minimálně zatěžující diagnostiku. Zvláště aktuální je tato otázka u kojenců a batolat, u kterých lze předpokládat rozvoj prvních – a tedy potencionálně reversibilních – změn. V souvislosti s technickým pokrokem byla vyvinuta řada metod jak funkční, tak i morfologické diagnostiky, které mají potenciál tyto odchylky od normy zachytit. Jejich využití v klinické praxi však zatím není běžné. V tomto ohledu je třeba kriticky zhodnotit jejich přínos a navrhnout racionální diagnostické algoritmy využitelné již v nejútlejším věku. Další neznámou v této oblasti zůstává vzájemný vztah morfologických a funkčních změn dýchacího traktu u dětí s chronickým plicním onemocněním. Dosavadní studie se ve většině případů zabývaly izolovaně buď morfologií, nebo funkcí. Proto dosud zůstávají funkční důsledky morfologických přestavbových změn neobjasněny. Předkládaná dizertační práce si klade za cíl přispět alespoň dílčím způsobem k zodpovězení těchto otázek.



## *Praktická část*

Praktická část předkládané dizertační práce hodnotí význam vybraných funkčních a morfologických vyšetřovacích metod pro detekci časných patofyziologických změn dýchání u dětí nejnižší věkové kategorie (pod 2 roky života). Studován je vzorek kojenců a batolat s chronickým respiračním onemocněním vyšetřených na Pediatrické klinice 2. LF UK a FN Motol mezi únorem 2014 a únorem 2019.

V návaznosti na teoretickou část (kapitola 2) budu v práci hodnotit dva aspekty patofyziologických změn dýchacího traktu v souvislosti s jeho chronickým onemocněním:

1. funkční změny ventilace plic,
2. morfologické změny sliznice dýchacích cest.

V této souvislosti jsem z širokého spektra vyšetřovacích metod zmíněných v kapitole 3 vybral dvě:

1. vyšetření funkce plic u nespolupracujících dětí (iPFT),
2. mikroskopické vyšetření endobronchiálních bioptických vzorků sliznice dýchacích cest (EBB) na přítomnost remodelačních změn.

Výsledky těchto sofistikovaných vyšetřovacích metod budou analyzovány nejprve po stránce metodologické (bezpečnost, proveditelnost) a poté v kontextu klinického stavu pacientů (přínos vyšetření pro běžnou praxi).

## 4. Cíle práce a hypotézy

Cílem práce je kriticky zhodnotit využitelnost vyšetření iPFT a EBB pro běžnou klinickou praxi u dětí ve věkové kategorii pod 2 roky života. V této souvislosti byly definovány následující hlavní cíle práce:

- posouzení bezpečnosti iPFT a EBB,
- posouzení proveditelnosti iPFT a EBB,
- posouzení vzájemného vztahu jednotlivých metod vyšetření iPFT,
- posouzení vztahu funkčních a morfologických změn u časných stádií vybraných chronických respiračních onemocnění (vztah mezi iPFT a EBB).

S ohledem na zamýšlený design studie byly definovány další otázky, na které sice nelze v daném uspořádání studie podat jednoznačnou odpověď, nicméně je možno takto získat alespoň dílčí informace. Tyto vedlejší cíle práce zahrnují:

- zhodnocení vztahu iPFT a EBB ke klinickým charakteristikám onemocnění – tzn. jejich schopnost rozlišit mezi podskupinami pacientů s různým průběhem onemocnění,
- posoudit funkci periferních chemoreceptorů u pacientů s CF a opakovanými obstrukčními epizodami pomocí charakteristik jejich ventilační odpovědi na hyperoxii.

### 4.1. Pracovní hypotézy

Na základě našich zkušeností a v kontextu dříve publikovaných informací o iPFT a EBB jsme formulovali následující hypotézy:

- Studované metody jsou bezpečné i u dětí ve věku pod 2 roky života.
- Navzdory relativně běžnému využití iPFT a EBB v rámci výzkumných aktivit bude proveditelnost a výtěžnost těchto metod v klinické praxi nižší, vliv budou mít i zkušenosti personálu, zázemí laboratoře a individuální nastavení vyšetřovacího protokolu. Z tohoto důvodu nelze data pocházející z cizích pracovišť považovat za plně přenositelná do našeho prostředí, a proto se těmto otázkám věnujeme specificky v podmínkách Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol.
- Technické aspekty měření významným způsobem ovlivňují výsledky funkčního vyšetření a jejich interpretaci. I přes určitý překryv metod iPFT nebudou ekvivalentní parametry stanovené různými metodami vzájemně zaměnitelné.

- Vztah poruchy funkce plic a makroskopických strukturálních změn dle zobrazovacích metod [Gustafsson PM. et al., 2008] či zánětlivých změn v tekutině bronchoalveolární laváže (BALF) [Ramsey KA. et al., 2017], [Harris WT. et al., 2009], [Nixon GM. et al., 2002] byl již prokázán. Naopak vztah mezi poruchou funkce plic a mikroskopickými remodelačními změnami stěny dýchacích cest (šířka bazální membrány) zatím nalezen nebyl [Hilliard TN. et al., 2007], [Hoňková L., et al., 2014]. Předpokládáme však, že i v tomto případě platí obecný princip „morfolgie sleduje funkci“ a absence tohoto vztahu v předchozích studiích byla způsobena neoptimální metodikou práce.
- Na základě zkušeností z naší laboratoře a kliniky se domníváme, že iPFT může mít význam pro klinickou praxi u celé řady patologií respiračního traktu (např. opakované obstrukční epizody, vrozené vady dýchacího traktu, atd.). Klinická relevance vyšetření iPFT však není bezesbýtku akceptována a někteří autoři jeho význam dokonce zpochybňují. V dostupné literatuře existuje pouze několik prací zabývajících se touto tematikou v přesně definovaných skupinách pacientů. S využitím dat získaných v rámci předkládané dizertační práce plánuji zhodnotit schopnost metod iPFT zachytit rozdíly v klinickém průběhu onemocnění a nepřímým tak jejich klinický přínos.
- Ventilační odpověď na hyperoxii jako ukazatel funkce periferních chemoreceptorů se může lišit mezi různými diagnózami v důsledku jejich odlišné patofyziologie. Ačkoliv byla dosud ventilační odpověď na hyperoxii studována především u novorozenců, některé patologie mohou z perinatálního období perzistovat i do vyššího věku. Dysfunkce periferních chemoreceptorů se tak může uplatňovat u řady patologických stavů jako je syndrom náhlého úmrtí kojence (SIDS) či syndrom ROHHAD (Rapid-Onset Obesity With Hypothalamic Dysfunction, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation). Neméně významné jsou tyto informace i pro metodiku vyšetření iPFT (zejména N<sub>2</sub>-MBW, kde přechodná, hyperoxií způsobená hypoventilace během washout fáze ovlivní efektivitu vymývání dusíku z plic).

## **4.2. Design studie**

Předkládaná práce má charakter průřezové observační studie zabývající se technickými aspekty a klinickou relevancí metod iPFT a EBB. Dílčí otázky jsou studovány i na podskupině pacientů sledovaných longitudinálně v souvislosti s úpravou léčebných intervencí.

## 5. Metodika práce

### 5.1. Pacienti

Studijní soubor tvořilo 109 pacientů vyšetřených na Pediatrické klinice 2. LF UK a FN Motol. Jednalo se o pacienty z těchto diagnostických skupin (diagnostická kritéria viz dále):

- cystická fibróza (CF),
- opakované obstrukční epizody (AB),
- primární ciliární dyskineze (PCD),
- vrozená brániční kýla (CDH),
- intersticiální plicní onemocnění (chILD).

Všichni pacienti byli vyšetřeni primárně z klinické indikace na základě rozhodnutí ošetřujícího lékaře. Do studie byli pacienti zahrnuti až po souhlasu rodičů, jestliže u nich bylo v období mezi únorem 2014 a únorem 2019. U 19 pacientů byl k dispozici i materiál z bronchoskopie s odběrem vzorku EBB a BALF.

Diagnóza klasické formy cystické fibrózy byla stanovena na základě současných doporučení Evropské společnosti pro cystickou fibrózu (ECFS) [Castellani C. et al., 2018] a zahrnovala následující kritéria:

1. klinické příznaky kompatibilní s cystickou fibrózou (např. mekoniový ileus, difúzní bronchiektázie) a/nebo pozitivní novorozenecký screening a/nebo pozitivní rodinná anamnéza CF

a zároveň

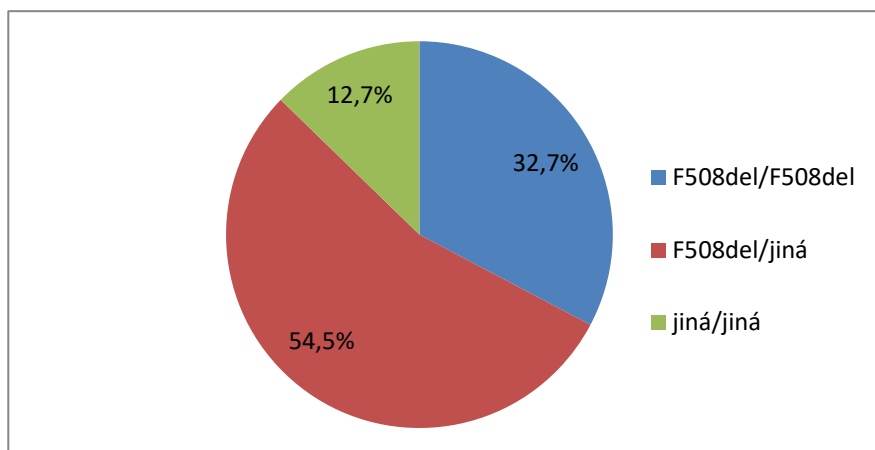
2. průkaz dysfunkce chloridového kanálu (CFTR – cystic fibrosis transmembrane regulator) – hodnoceno většinou pomocí potního testu (vyšetření koncentrace chloridů v potu)

a/nebo

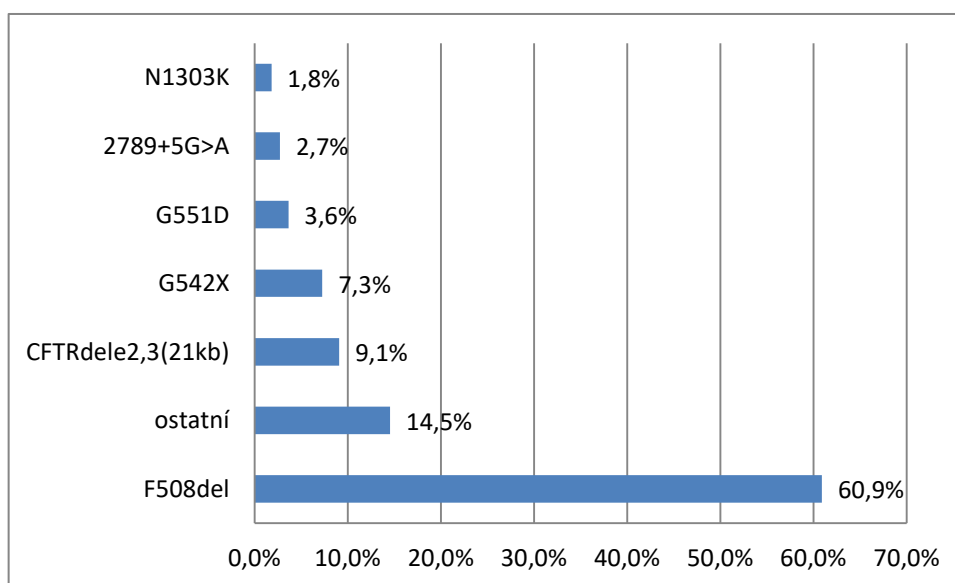
3. průkaz dvou kauzálních mutací CFTR genu v pozici trans.

Do studijního souboru bylo zařazeno 55 pacientů s klasickou formou CF. Vzhledem k situaci v České republice a nízkému věku vyšetřovaných pacientů byla naprostá většina dětí odhalena novorozeneckým screeningem a diagnóza potvrzena pomocí potního testu. Osm pacientů (16,3 %) se manifestovalo v novorozeneckém věku mekoniovým ileem a jejich diagnóza tak byla stanovena již před zjištěnou pozitivitou novorozeneckého screeningu. U všech těchto pacientů následně novorozenecký screening vyšel pozitivní. Pouze jeden pacient měl negativní novorozenecký screening a byl diagnostikován na podkladě příznaků (neprospívání) v 10 měsících věku. U všech dětí byly detekovány obě kauzální mutace. Zastoupení různých

genotypů je znázorněno v Grafu 5.1.1, zastoupení nejčastějších mutací v Grafu 5.1.2. Skupina pacientů s CF byla dále rozdělena na dvě podskupiny podle věku: CF<sub>malí</sub> – zahrnující děti vyšetřené v průběhu prvních 6 měsíců života a CF<sub>velcí</sub> – zahrnující děti vyšetřené po 6. měsíci života.



Graf 5.1.1. Procentuální zastoupení různých genotypů u pacientů s klasickou formou cystické fibrózy<sup>5</sup>



Graf 5.1.2. Procentuální zastoupení nejčastějších CF-způsobujících mutací<sup>6</sup>

<sup>5</sup> F508del/F508del – homozygot pro mutaci F508del; F508del/jiná – smíšený heterozygot pro mutaci F508del a jinou CF způsobující mutaci; jiná/jiná – heterozygot pro 2 CF způsobující mutace jiné než F508del.

<sup>6</sup> „Ostatní“ CF způsobující mutace zahrnují: Y1424X; 526\_527delAT; 1717-2A>G; 1774delCT; 2184insA; 3659delC, N1301K; 2143delT; 621+1G>T; 1204\_1205delGT; I507del; 1341+1G>A; 574delA; 2143delT, které byly zastoupeny vždy po jedné (0,9 %). Použito legacy označení.

Primární ciliární dyskineze byla diagnostikována podle aktuálního mezinárodního doporučení [Lucas JS. et al., 2017] na základě anamnestických údajů a vyšetření ciliární aktivity pomocí vysokorychlostní videomikroskopie. Diagnóza byla u všech pacientů potvrzena přítomností jednoznačného strukturálního defektu axonematu řasinky při elektron-mikroskopickém vyšetření její ultrastruktury. Ve studovaném souboru byli 3 pacienti s PCD (u dvou deficit pouze zevních dyneinových ramének, u jednoho deficit zevních i vnitřních dyneinových ramének). Genetické vyšetření u nich zatím nebylo provedeno.

Většina pacientů s vrozenou brániční kýlou v souboru byla diagnostikována prenatálně při ultrazvukovém screeningu, pouze 2 (22,2 %) byli diagnostikováni postnatálně na základě klinických příznaků a RTG nálezů. Diagnóza jednostranné hernie byla u všech potvrzena peroperačně, přičemž u 3 z nich byla pro korekci defektu použita goretexová záplata, u 6 byl defekt uzavřen přímou suturou.

Diagnóza intersticiálního plicního procesu (chILD) byla stanovena u 7 dětí na základě klinické prezentace dítěte (tachypnoe, retrakce měkkých částí hrudníku, poklesy saturace, poslechový nález chrůpků) a typického HRCT nálezů plic (opacity mléčného skla, zesílení plicního intersticia, event. i air-trapping a nerovnoměrná ventilace/perfúze plic). K upřesnění diagnózy byla provedena další vyšetření, 71,4 % pacientů podstoupilo video-asistovanou plicní biopsii. V souboru byla zahrnuta jedna pacientka s hyperplasií neuroendokrinních buněk (NEHI – neuroendocrine cell hyperplasia of infancy), 1 pacientka s plicním postižením při histiocytóze z Langerhansových buněk, 1 pacient s intersticiálním plicním postižením při opakovaných aspiracích a 4 pacienti se suspektním postinfekčním intersticiálním plicním procesem charakteru obliterující bronchiolitidy.

Skupina pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami, resp. v riziku rozvoje astmatu (skupina AB) zahrnovala 35 kojenců a batolat. Za obstrukční epizodu byl považován jakýkoliv stav s kašlem, případně i známkami tachydyspnoe, u kterého byl lékařem potvrzen poslechový nález obstrukčních fenoménů. Děti starší 1 roku byly do studie začleněny, pokud měly v anamnéze alespoň 3 takovéto epizody, děti mladší 1 roku alespoň 2. U všech pacientů pak bylo hodnoceno riziko rozvoje asthma bronchiale na základě klinického indexu rizika pro astma (API – asthma predictive index) podle Castro-Rodrígueza [Castro-Rodríguez J.A. et al, 2000]. Navzdory nízkému věku byl API považován za pozitivní u dětí, které splňovaly alespoň 1 ze 2 velkých kritérií nebo 2 ze 3 malých kritérií. Rozlišení na „loose“ a „stringend“ API nebylo provedeno. Děti s pozitivním API tvořily vysoce rizikovou podskupinu pacientů (skupina API+), děti s negativním API pak skupinu s nízkým rizikem (skupina API-).

Antropometrické údaje pacientů za celý studovaný soubor i po jednotlivých diagnostických skupinách jsou uvedeny v tabulce 5.1.1. tabulky 5.1.2. a 5.1.3. ukazují porovnání podskupin CF<sub>malí</sub> a CF<sub>velcí</sub>, resp. API+ a API-.

Tab 5.1.1. Antropometrické údaje pacientů zahrnutých do studijního souboru.<sup>7</sup>

|                             | Celý soubor | CF          | AB          | CDH         | chILD       | PCD         |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Počet pacientů              | 109         | 55          | 35          | 9           | 7           | 3           |
| Počet chlapců (%)           | 60 (55,0)   | 23 (41,8)   | 22 (62,9)   | 7 (77,8)    | 5 (71,4)    | 3 (100,0)   |
| Věk při iPFT [týdny]        | 54,6 ± 30,4 | 50,4 ± 32,1 | 62,8 ± 31,2 | 56,8 ± 20,7 | 43,1 ± 18,3 | 54,4 ± 46,7 |
| Délka [cm]                  | 72,3 ± 8,7  | 70,1 ± 10,9 | 74,9 ± 7,4  | 75,7 ± 4,3  | 71,6 ± 2,4  | 73,7 ± 12,1 |
| Délka [z-skóre]             | -0,6 ± 1,1  | -0,6 ± 1,2  | -0,6 ± 0,9  | -0,4 ± 1,2  | -0,6 ± 0,9  | -0,2 ± 0,3  |
| Hmotnost [kg]               | 8,9 ± 2,5   | 8,1 ± 3,2   | 10,5 ± 1,8  | 8,9 ± 1,6   | 7,9 ± 1,0   | 8,3 ± 3,5   |
| Hmotnost [z-skóre]          | -0,7 ± 1,1  | -0,7 ± 1,3  | -0,3 ± 0,8  | -1,2 ± 0,9  | -1,4 ± 0,9  | -1,1 ± 0,5  |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ]    | 16,2 ± 2,0  | 15,9 ± 2,5  | 17,1 ± 1,6  | 15,4 ± 1,6  | 15,3 ± 1,4  | 14,5 ± 1,7  |
| BMI z-skóre                 | -0,3 ± 1,1  | -0,5 ± 1,2  | 0,3 ± 0,9   | -1,0 ± 0,9  | -1,1 ± 0,9  | -1,1 ± 0,9  |
| Prematurita < 37+0 g.t. (%) | 17 (15,7)   | 6 (10,9)    | 8 (22,9)    | 2 (22,2)    | 0 (0)       | 1 (33,3)    |
| Porodní hmotnost [g]        | 3077 ± 499  | 3049 ± 527  | 3004 ± 473  | 3009 ± 490  | 3606 ± 341  | 3417 ± 676  |
| Porodní délka [cm]          | 48,9 ± 2,5  | 48,5 ± 3,0  | 48,1 ± 1,8  | 52,0 ± 2,0  | 50,6 ± 1,9  | 51,3 ± 3,1  |

<sup>7</sup> Hodnoty udány jako průměr ± směrodatná odchylka, pouze zastoupení chlapců a dětí z prematurity vyjádřeno jako počet (%).



Tab. 5.1.2. Antropometrické charakteristiky pacientů s CF dle podskupin (CF<sub>malí</sub> a CF<sub>velcí</sub>) včetně jejich statistického porovnání.<sup>8</sup>

|                          |             | CF <sub>malí</sub><br>(n = 16) | CF <sub>velcí</sub><br>(n = 39) | Porovnání CF <sub>velcí</sub> a<br>CF <sub>malí</sub> (p-hodnoty) |
|--------------------------|-------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| Muži (%)                 |             | 9 (56,3)                       | 14 (35,9)                       | 0,423†  |
| Věk [týdny]              |             | 8,3 ± 5,1                      | 67,7 ± 24,6                     | < 0,001   |
| Délka [cm]               |             | 55,3 ± 4,4                     | 76,2 ± 13,6                     | < 0,001   |
| Délka z-skóre            |             | -0,48 ± 0,96                   | -0,59 ± 1,35                    | 0,627   |
| Hmotnost [kg]            |             | 4,1 ± 1,4                      | 9,7 ± 3,9                       | < 0,001   |
| Hmotnost z-skóre         |             | -0,95 ± 0,89                   | -0,57 ± 1,44                    | 0,732   |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ] |             | 13,1 ± 2,1                     | 17,0 ± 2,7                      | < 0,001   |
| BMI z-skóre              |             | -1,04 ± 1,41                   | -0,21 ± 1,09                    | 0,064   |
| Prematurita < 37+0 g.t.  |             | 1 (6,3)                        | 5 (12,8)                        | 0,243†  |
| Porodní hmotnost [g]     |             | 3214,6 ± 384,7                 | 2980,3 ± 585,9                  | 0,302   |
| Porodní délka [cm]       |             | 49,1 ± 1,1                     | 48,3 ± 3,8                      | 0,148   |
| genotyp                  | F508d/F508d | 4 (25,0)                       | 14 (35,9)                       | 0,421†  |
|                          | F508d/other | 11 (68,9)                      | 19 (48,7)                       | 0,213†  |
|                          | other/other | 1 (6,3)                        | 6 (15,4)                        | 0,321†  |

<sup>8</sup> Porovnání charakteristik mezi skupinami API+ a API- bylo provedeno pomocí t-testu, pouze p-hodnoty označené † pocházející z testu rozdílu dvou podílů. Tučně zvýrazněné údaje jsou rozdíly statisticky významné (p-hodnota > 0,05).

Tab. 5.1.3. Antropometrické a perinatální údaje pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami podle podskupin (API+ a API-) včetně jejich statistického porovnání.<sup>9</sup>

|                          | API+<br>(n = 14) | API-<br>(n = 21) | Porovnání<br>API+ a API-<br>(p hodnota) |
|--------------------------|------------------|------------------|---|
| Muži (%)                 | 9 (64,3)         | 13 (76,5)        | 0,420†                                  |
| Věk [týdny]              | 66,7 ± 35,4      | 60,2 ± 28,4      | 0,357                                   |
| Délka [cm]               | 77,8 ± 7,8       | 73,0 ± 7,1       | 0,375                                   |
| Délka z-skóre            | -0,31 ± 1,52     | -0,81 ± 0,55     | 0,235                                   |
| Hmotnost [kg]            | 10,7 ± 2,5       | 10,4 ± 1,3       | 0,525                                   |
| Hmotnost z-skóre         | -0,08 ± 0,92     | -0,36 ± 0,67     | 0,215                                   |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ] | 17,8 ± 1,6       | 16,6 ± 1,6       | 0,459                                   |
| BMI z-skóre              | 0,33 ± 1,14      | 0,35 ± 0,76      | 0,877                                   |
| Prematurita < 37+0 g.t.  | 4 (28,6)         | 4 (19,0)         | 0,426†                                  |
| Porodní hmotnost [g]     | 3042,1 ± 462,5   | 2979,3 ± 479,3   | 0,716                                   |
| Porodní délka [cm]       | 49,4 ± 1,5       | 47,2 ± 2,0       | 0,312                                   |

## 5.2. Vyšetření

Pro účely předkládané studie byly u výše popsaného vzorku pacientů sesbírány relevantní anamnestické údaje, výsledky antropometrického měření a vyšetření funkce plic. U vybraných podskupin pacientů (CF a API-) pak byla hodnocena ventilační odpověď na hyperoxii a morfologie slizničních změn v rámci endobronchiálních biopsií (podskupiny CF, PCD a AB). Všechna vyšetření byla u pacientů prováděna primárně z klinické indikace na žádost ošetřujícího lékaře. Hodnocení výsledků vyšetření pro výzkumné účely bylo provedeno až po získání informovaného souhlasu zákonných zástupců s takovýmto zpracováním.

### 5.2.1. Anamnestické údaje

U všech pacientů byly zjištěny následující informace o perinatálním období a průběhu poporodní adaptace: gestační stáří v týdnech při porodu, prematurita – definovaná jako porod před dokončeným 37. týdnem, tzn. < 37+0 gestačních týdnů, porodní hmotnost v gramech,

<sup>9</sup> Porovnání charakteristik mezi skupinami API+ a API- bylo provedeno pomocí t-testu, pouze p-hodnoty označené † pocházející z testu rozdílu dvou podílů.

hypotrofie – definovaná jako hmotnost pod 10. percentilem vzhledem ke gestačnímu stáří a pohlaví dle českých norem, porodní délka v centimetrech, skóre Apgarové v 1., 5. a 10. minutě, potřeba oxygenoterapie v časném novorozeneckém období (tzn. do 7. dne života) a nutnost ventilační podpory v časném novorozeneckém období.

Specificky u pacientů s cystickou fibrózou byly sledovány další údaje (genotyp, pankreatická insuficience, přítomnost mekoniového ileu s nutností chirurgické revize, způsob stanovení diagnózy, počet lehkých a těžkých exacerbací vztažený k věku v letech, počet dnů perorální a intravenózní antibiotické léčby nasazené na respirační příznaky vztažený k věku v letech, kultivační záchyt *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a komplexu *Burkholderia cepacia* a frekvence případného záchytu dané bakterie – intermitentní vs. chronická). Pankreatická insuficience byla hodnocena podle elastázy-1 ve stolici (hodnoty nižší než 200 µg/g svědčí pro insuficienci). Diagnóza CF byla stanovena na základě novorozeneckého screeningu, mekoniového ileu nebo klinických příznaků. Za lehkou exacerbaci byl považován vznik nebo zhoršení stávajících respiračních příznaků (kašel, zahlenění, změna charakteru odsávaných sekretů, dušnost, obtíže s krmením), které vedly k nasazení perorálních antibiotik, přičemž intenzivní péče za hospitalizace nebyla nutná. Těžká exacerpace byla definována jako vznik nebo zhoršení stávajících respiračních příznaků, které vedly k hospitalizaci a zahájení intravenózní antibiotické léčby event. i oxygenoterapie. Mikrobiální kolonizace byla hodnocena podle vzorků z horních cest dýchacích (hluboký nasopharyngeální aspirát). Intermitentní záchyt znamenal pozitivitu v méně než polovině dostupných vzorků (při alespoň 4 vyšetřených vzorcích za rok), chronický záchyt pak pozitivitu v 50 a více % vzorků.

U pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami byl hodnocen index klinického rizika pro rozvoj asthma bronchiale dle Castro-Rodríguez. Zjišťován byl počet obstrukčních epizod, pozitivita rodinné anamnézy pro asthma bronchiale (lékařem diagnostikované astma u rodičů), dále lékařem diagnostikovaný atopický ekzém u pacienta, absolutní a relativní počet eozinofilů v periferní krvi v období nejdéle 3 měsíce před vyšetřením iPFT (hranice positivity nastavena na 300 /µm<sup>3</sup> resp. 4 %), přítomnost obstrukčních epizod (pískotů) mimo období infekce a lékařem diagnostikovaná alergická rhinitida. U pacientů s kongenitální brániční hernií, intersticiálním plicním procesem a primární ciliární dyskinezi nebyly zaznamenány další anamnestické údaje, jelikož jejich statistické hodnocení by vzhledem k velikosti skupiny nebylo možné.

### 5.2.2. Antropometrická měření

Všichni pacienti byli před vyšetřením funkce plic zváženi na kojenecké váze a jejich délka změřena pomocí flexibilního stadiometru. Následně byl spočten index tělesné hmotnosti (BMI – body mass index) podle vzorce:

$$\text{BMI} = m/d^2,$$

kde  $m$  značí hmotnost v kilogramech a  $d$  délku v metrech.

Takto naměřené údaje byly vztaženy k českým národním normám z roku 2001 [Kobzova J. et al., 2004] – v případě délky, pro hmotnost a BMI byl použit „zmrzlý standard“ z roku 1991 [Lhotská L. et al., 1994]. Porucha růstu byla na průřezových datech definována jako aktuální délka pod 2 směrodatné odchylky normy pro daný věk a pohlaví, porucha výživy byla definována jako z-skóre BMI nižší než -1,3 (10. percentil). Vzhledem k průřezovému charakteru studie nebyla zohledněna dynamika těchto parametrů v čase.

### 5.2.3. Vyšetření funkce plic

Vyšetření funkce plic nespolupracujících dětí bylo provedeno v souladu s mezinárodními doporučeními, tak jak byly zmíněny v kapitole 3.2.1.2. Častěji používané metody iPFT v klinické praxi V rámci přípravy pacienti alespoň 2 hodiny před vyšetřením lačnili, v průběhu předcházejících 12 hod byl aplikován glycerinový čípek s cílem vyprázdnit rektum. Vyšetření bylo načasováno do období přirozeného spánku kojence s cílem snížit dávku podávaných sedativ. Vyšetření iPFT bylo prováděno u klinicky stabilních pacientů nejevících známky akutního respiračního infektu po dobu minimálně 14 dní. Důsledně byly respektovány kontraindikace tohoto vyšetření. Za absolutní kontraindikace považujeme:

- aktuální kardiopulmonální nestabilita pacienta,
- anamnéza nežádoucí reakce na sedaci,
- obličejová deformita znemožňující adekvátní utěsnění obličejové masky,
- stav 4 týdny po hrudní, břišní či kraniofaciální operaci.

Mezi relativní kontraindikace patří:

- nedostatečné lačnění,
- záchvatovité/křečové onemocnění a další neurologické stavy se zvýšeným rizikem hypoventilace při sedaci,
- implantovaný kardiostimulátor/kardioverter,
- akutní či doznívající infekce,

- velikost pacienta – váha nad 13 – 15 kg, délka nad 93 – 95 cm (omezené rozměry bodypletysmografu).

Vyšetření iPFT bylo provedeno v supinní poloze s hlavičkou v neutrální pozici či lehkém záklonu. Poloha krku byla fixována nafukovatelným polštářkem umístěným kolem hlavičky – obrázek 5.2.1. Na ústa a nos byla nasazena obličejová maska Rendel-Barker, utěsnění bylo provedeno pomocí inertní silikonové pasty (CosiMed Therapeutic Putty, CosiMed, GmbH, Emmerthal, Německo). Velikosti masky byly voleny č. 0 až č. 3 tak, aby byla zajištěna adekvátní těsnost a zároveň co nejmenší mrtvý prostor přístroje (pod 2 ml/kg). Před nasazením obličejové masky byla aspekci zkontrolována poloha jazyka v dutině ústní, aby nedocházelo k obstrukci horních cest dýchacích. Po nasazení byla vizuálně zkontrolována také průchodnost nosu a úst (průhledný materiál obličejové masky). Během vyšetření a do plného probuzení byla pacientům kontinuálně monitorována saturace hemoglobinu kyslíkem (SpO<sub>2</sub>) a tepová frekvence. Evidovány byly poklesy saturace pod 90 %, epizody hypoventilace (pokles ventilace pod 150 (ml/min)/kg po dobu alespoň 30 sekund), apnoe (zástava dechu trvající déle než 15 s) a bradykardie (pokles tepové frekvence pod 80/min po dobu 30 sekund). V průběhu vlastního měření byla také opakovaně kontrolována poloha masky, její těsnost a volná průchodnost nosu a úst. Dále byla věnována pozornost poloze hlavy vzhledem k tělu (průchodnost horních cest dýchacích) a pravidelnosti dechového vzoru se stabilním dechovým objemem (cíl 7 – 10 ml/kg) a stabilní objemovou hladinou konce výdechu (EEL – end expiratory level).

Obr. 5.2.1. Poloha dítěte při vyšetření iPFT – zde metoda MBW.



V rámci celého vyšetřovacího protokolu bylo provedeno 5, resp. 6 metod v následujícím pevně daném pořadí:

1. test vícedechového vyplavování dusíku z plic ( $N_2$ -MBW – nitrogen multiple breath washout test),
2. test vícedechového vyplavování hexafluoridu síry z plic ( $SF_6$ -MBW – sulphur hexafluoride multiple breath washout test) – dostupné od března 2016,
3. dětská bodypletysmografie (BP – bodypletysmography),
4. měření pružných vlastností dýchacího traktu jednookluzní metodou (RC – resistance-compliance),
5. analýza klidového dechového vzoru (Tidal – tidal breath analysis) a
6. rychlá torakoabdominální komprese (TV-RTC – tidal volume rapid thoracoabdominal compression) – měření usilovných výdechových průtoků.

Metody  $N_2$ -MBW a  $SF_6$ -MBW byly provedeny na přístroji Exhalyzer D, Ecomedics, Duernten, Švýcarsko. K měření průtoku je využit ultrazvukový snímač pracující na dopplerově principu. Koncentrace  $CO_2$  je stanovena infračerveným snímačem, koncentrace  $O_2$  laser-diodovým čidlem a koncentrace  $N_2$  je určena nepřímou – výpočtem ze vztahu:

$$f_{N_2} = 1 - f_{O_2} - f_{CO_2} - f_{Ar},$$

kde  $f$  značí frakční koncentraci daného plynu a frakční koncentrace argonu ( $f_{Ar}$ ) je vypočtena jako fixní část koncentrace  $N_2$  ( $f_{Ar} = f_{N_2} \cdot 0,0093 / 0,7881$ ). V případě měření koncentrace

$SF_6$  je pak využito i měření molární hmotnosti proudícího plynu (opět pomocí ultrazvukového čidla). Do března 2016 byl používán software Spiroware 3.1.6., který byl následně nahrazen verzí 3.2.0. Vzhledem ke změnám v algoritmu výpočtu různých výstupních parametrů a zavedení dynamické korekce zpoždění signálů  $O_2$  a  $CO_2$  v novější verzi byly všechny výsledky získané ve starším software přepočítány s použitím těchto nových algoritmů. Měření bylo provedeno na základě mezinárodně platných doporučení [Robinson PD. et al., 2013], [Jensen R. et al., 2013]. V případě  $N_2$ -MBW nejsou pro kojenecký věk k dispozici referenční hodnoty od zdravých dětí, výsledky tedy byly udávány pouze v absolutních číslech. V případě  $SF_6$ -MBW byly využity normy publikované v roce 2013 [Lum S. et al., 2013] pro výpočet z-skóre daného parametru (viz dále). Výstupní parametry testů  $N_2$ -MBW a  $SF_6$ -MBW včetně jejich definice jsou uvedeny v tabulce 5.2.1.

Metody 3. – 6. byly provedeny na přístroji MasterScreen Babybody, Jaeger, Viasys, Německo, verze software V4.67a. Přístroj využívá vyhřívaný tlakově-diferenční pneumotachograf k měření průtoku, tlakové změny v dutině ústní a kabině pletysmografu jsou

pak měřeny citlivým tlakovým snímačem. Postup měření a hodnocení akceptovatelnosti naměřených výsledků byly ve shodě s mezinárodně platnými doporučeními zmíněnými v kapitole 3.2.1.2. Častěji používané metody iPFT v klinické praxi

Výstupní parametry jednotlivých metod včetně jejich definice, jednotek a použité normy jsou uvedeny v tabulce 5.2.1. Princip jednotlivých vyšetřovacích metod je uveden v kapitole 3.2.1.2. Častěji používané metody iPFT v klinické praxi

Tab. 5.2.1. Výstupní parametry jednotlivých metod iPFT a jejich definice.<sup>10</sup>

| Metoda   | Parametr              | Definice  | Jednotka          | Normy |
|--|-----------------------|---|-------------------|-------|
| Test vícedechového vyplavování dusíku z plic (N <sub>2</sub> -MBW)             | FRC <sub>N2</sub>     | Funkční reziduální kapacita z N <sub>2</sub> -MBW                         | ml                | N.A.  |
|  | LCI <sub>2,5N2</sub>  | Očišťovací index plic na úrovni 2,5 % původní koncentrace N <sub>2</sub>  | -                 | N.A.  |
|  | LCI <sub>5N2</sub>    | Očišťovací index plic na úrovni 5 % původní koncentrace N <sub>2</sub>    | -                 | N.A.  |
| Test vícedechového vyplavování hexafluoridu síry z plic (SF <sub>6</sub> -MBW) | FRC <sub>SF6</sub>    | Funkční reziduální kapacita z SF <sub>6</sub> -MBW                        | ml                | (i)   |
|  | LCI <sub>2,5SF6</sub> | Očišťovací index plic na úrovni 2,5 % původní koncentrace SF <sub>6</sub> | -                 | (i)   |
|  | LCI <sub>5SF6</sub>   | Očišťovací index plic na úrovni 5 % původní koncentrace SF <sub>6</sub>   | -                 | N.A.  |
| Bodypletysmografie (BP)  | FRC <sub>box</sub>    | Funkční reziduální kapacita z bodypletysmografie                          | ml                | (ii)  |
|  | R <sub>aw</sub>       | Odpor dýchacích cest  | kPa*s/l           | (iii) |
| Analýza klidového dechového vzoru (Tidal)                                      | RR                    | Dechová frekvence   | min <sup>-1</sup> | (iv)  |
|  | V <sub>t</sub>        | Dechový objem   | ml                | (iv)  |
|  | tPTEF/tE              | Čas dosažení maximálního průtoku během výdechu ku celkovému času výdechu  | -                 | (iv)  |
|  | tI/tE                 | Čas nádechu ku času výdechu   | -                 | N.A.  |
| Měření pružných vlastností dýchacího traktu jednookluzní metodou (RC)          | C <sub>rs</sub>       | Poddajnost dýchacího traktu   | ml/kPa            | (ii)  |
|  | R <sub>rs</sub>       | Odpor dýchacího traktu  | kPa*s/l           | (ii)  |
| Rychlá torakoabdominální komprese (TV-RTC)                                     | V' maxFRC             | Maximální výdechový průtok na úrovni FRC                                  | ml/s              | (v)   |

<sup>10</sup> N.A. normy pro kojenecký věk nedostupné; (i) Lum S. et al., 2013; (ii) Nguyen TT. et al., 2013; (iii) Godfrey S. et al., 2009, (iv) Ranganatan SC. et al., 2003; (v) Hoo AF. et al, 2002



#### 5.2.4. Analýza ventilační odpovědi na hyperoxii

Pro potřeby analýzy ventilační odpovědi kojenců a batolat na hyperoxii byl, ve spolupráci s doc. RNDr. Miroslavem Kouckým, CSc. z Katedry aplikované matematiky Technické Univerzity v Liberci, vyvinut původní software umožňující vypočítat a podrobně porovnávat různé ventilační parametry naměřené během N<sub>2</sub>-MBW za normoxických a hyperoxických podmínek. Tímto způsobem je kvantitativně i kvalitativně hodnocena funkce periferních chemoreceptorů (karotických tělísek) [Dejours P., 1962]. Vstupní informaci představují data z dusíkového washoutu, která jsou pro potřeby této analýzy zpracovávána off-line (po naměření). Žádným způsobem tedy není komplikováno či prodlužováno vlastní vyšetření. Naopak má tato analýza potenciál zvýšit informační hodnotu dusíkového washoutu.

Software je vytvořen v databázi Microsoft Access 2010. Je schopen automatizovaně načítat naměřená data z přístroje Exhalyzer D, která jsou ukládána v podobě tzv. B-file. Tyto soubory obsahují mimo jiné synchronizované hodnoty průtoku, měřené koncentrace CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> a dopočítanou hodnotu koncentrace N<sub>2</sub>, vše ukládané á 5 ms. Prvním krokem analýzy je detekce počátků nádechů a výdechů. K tomuto účelu byla použita kombinace prahového a vyhlazovacího algoritmu [Bates JH. et al., 2000], [Horáček J., Koucký V., Hladík M., 2018]. Pro každý dech jsou pak spočteny tyto klinicky významné parametry:

1. dechový objem (V<sub>t</sub>) – počítaný integrací průtoku v čase, udávaný v ml, následně vztažen k hmotnosti pacienta (ml/kg);
2. dechová frekvence (RR) – počítaná jako 60 děleno dobou trvání nádechu a výdechu v sekundách, výsledná frekvence udávaná jako počet dechů za minutu;
3. minutová ventilace (VE) – počítaná jako součin dechové frekvence a dechového objemu, vyjádřena v ml/min, následně vztažena k hmotnosti pacienta – (ml/min)/kg;
4. poměr času do dosažení maximálního výdechového průtoku k času celého výdechu (tPTEF/tE) – stanoveno na základě detailní analýzy průběhu průtoku v čase;
5. poměr času inspira a expira (tI/tE) – stanoveno na základě časové analýzy dechových fází;
6. maximální koncentrace CO<sub>2</sub> na konci výdechu (etCO<sub>2</sub>), vyjádřeno v %;

Kromě těchto klinicky aplikovatelných parametrů umožňuje software počítat další prakticky libovolně definované charakteristiky klidového dechového vzoru.

Další funkcí software je automatizované rozlišení mezi fází normoxickou a hyperoxickou (s následnou možností ruční korekce) a provedení analýzy ventilační odpovědi na hyperoxii. Jako první dech za podmínek hyperoxie je vyhodnocen ten, během kterého klesne koncentrace dusíku v nádechu pod 5 %. Poslední dech hyperoxie je stanoven buď automaticky jako poslední kompletně zaznamenaný dech, nebo je stanoven manuálně podle individuálních potřeb analýzy. V dalším kroku je stanoven čas ventilační odpovědi na hyperoxii (HRT1), který je definován jako doba od počátku hyperoxie do prvního dechu s hodnotou VE pod 5. percentilem normoxických hodnot (tzn. signifikantní pokles oproti normoxii). Vzhledem k fluktuacím aktuálních hodnot VE jednotlivých dechů by bylo hodnocení založené pouze na aktuálních hodnotách VE daného dechu náchylné k nepřesnostem. Stanovení výše zmíněného dechu je tedy provedeno sofistikovanějším přístupem spočívajícím v kombinaci metody klouzavých průměrů různých řádů. Pro každý dech je takto spočtena hodnota VE metodou klouzavého průměru 1., 2., 3. a 5. řádu a dech, u kterého VE spočtená alespoň třemi ze čtyř metod leží pod 5. percentilem normoxických hodnot, je považován za první dech se signifikantním poklesem ventilace.

V případě, že je detekován čas HRT1, je následně stanoven i čas HRT2, který označuje dobu od počátku hyperoxie do prvního signifikantního vzestupu VE zpět do 95% intervalu spolehlivosti normoxických hodnot VE (signifikantní vzestup určen stejnou kombinací algoritmů jako v případě HRT1). V případě dalšího signifikantního vzestupu hodnot VE nad 95. percentil je určen i čas HRT3. Pomocí kombinace těchto tří časů lze popsat několik typů ventilační odpovědi na hyperoxii. Typickým vzorem je tzv. bifázická ventilační odpověď na hyperoxii [Mortola JP. et al., 1992], u které jsou určeny časy HRT1 a HRT2, event. i HRT3. Kromě tohoto typu odpovědi lze ještě diferencovat setrvalou ventilační odpověď na hyperoxii (stanoven pouze HRT1, k vzestupu VE během zaznamenané doby nedošlo), vzestupnou odpověď (stanoven pouze HRT3, zaznamenán pouze vzestup VE, k iniciálnímu poklesu nedošlo) a nulovou odpověď (není stanoven HRT1, 2 ani 3, VE zůstává v pásmu 95 % normoxických hodnot). Různé typy ventilační odpovědi tak určují kvalitativní charakteristiky funkce periferních chemoreceptorů.

Pro kvantifikaci funkce karotických tělísek jsme využili jednak časování ventilační odpovědi na hyperoxii (HRT1 – 3) a dále míru poklesu VE za hyperoxie oproti normoxii (vyjádřeno v %). Pokles byl posuzován vzhledem k minimálním hodnotám VE za hyperoxie (VEdrop min%), průměrným hodnotám během hyperoxie (VEdrop mean%) a průměrným hodnotám za dobu poklesu – tzn. mezi HRT1 a HRT2 pokud byl stanoven (VEdrop pokles%).

Vzhledem k významné variabilitě zmíněných kvantitativních charakteristik ventilační odpovědi na hyperoxii byla data manuálně očištěna od odlehlých pozorování. V případě, že koeficient variability daného parametru byl u některého z pacientů vyšší než 30 % a zároveň byla k dispozici 3 a více měření, hodnota nejvíce se odlišující od průměru byla vyřazena.

V rámci předkládané dizertační práce byl popsán software využit ke studiu ventilační odpovědi kojenců a batolat na hyperoxii. Do této studie byli zahrnuti pacienti ze dvou nejpočetnějších podskupin souboru – CF a AB. Vyčleněni byli pacienti z prematurity (< 37. g.t.) a s porušenou poporodní adaptací (nutnost ventilační podpory či léčby kyslíkem v časném novorozeneckém období), jelikož tyto aspekty mají vliv na funkci periferních chemoreceptorů [Bates ML. et al., 2013], [Hertzberg T., Lagercrantz H., 1987]. V případě pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami byli analyzováni pouze pacienti z API-podskupiny. Výsledný počet pacientů byl 35 s CF a 14 s opakovanými obstrukčními epizodami a negativním API. Mezi těmito dvěma skupinami byly porovnány kvalitativní a kvantitativní charakteristiky ventilační odpovědi na hyperoxii. Dále byla studována souvislost ventilační odpovědi s věkem pacienta a dalšími antropometrickými charakteristikami.

### ***5.2.5. Hodnocení strukturálních změn sliznice dýchacích cest***

Morfologie sliznice dýchacího traktu pacientů s chronickým respiračním onemocněním byla studována ve vzorcích endobronchiálních biopsií odebraných při klinicky indikovaném bronchoskopickém vyšetření. K dispozici byl materiál pouze u malé podskupiny pacientů (n = 19) s cystickou fibrózou, primární ciliární dyskinezi a opakovanými obstrukčními epizodami, resp. v riziku rozvoje asthma bronchiale. Výzkumné analýzy byly na vzorcích provedeny až po zhodnocení klinicky relevantních aspektů, tak jak je doporučováno Evropskou respirační společností (ERS) [Midulla F. et al., 2003]. Z archivu Ústavu histologie a embryologie 2. LF UK byly využity vzorky „zdravých“ kontrol odpovídajícího věku. Jednalo se o děti ve věku do 2 let, které podstoupily bronchoskopii pro patologii horních cest dýchacích (např. stridor, dysfonie), případně se jednalo o kontrolu po úspěšné extrakci cizího tělesa. Odběr bioptického vzorku určeného výhradně pro výzkumné účely byl proveden po souhlasu rodičů a s ohledem na vysokou bezpečnost endobronchiální biopsie [Salva PS. et al., 2003], [De Blic J. et al., 2002], [Saglanı S. et al., 2003], [Molina-Teran A. et al., 2006].

Bronchoskopie byla provedena v celkové anestezii (intravenózní propofol + inhalační sevofluran) za spontánní ventilace bronchoskopem Olympus BF-XP60 nebo 3C40. Vzorek endobronchiální biopsie byl odebrán ze segmentálních karin dolního laloku vpravo pomocí

bioptických kleští Olympus FB-56D-1 (oválné branže s krysím zubem, průměr 1,2 mm). Bezprostředně po odebrání byl vzorek tkáně fixován v čerstvém 4% roztoku paraformaldehydu v PBS (phosphate-buffered saline) o pH 7,4 po dobu 4 hodin. Následně byl přes noc ponechán v PBS při teplotě 4°C. Poté byly vzorky dehydratovány promytím v alkoholové řadě vzrůstající koncentrace, projasněny chloroformem a zality do parafínu. Na závěr byly nakrájeny na 3 – 5 µm silné řezy.

Ve studii byly hodnoceny remodelační změny bronchiální sliznice – zejména kvalitativní a kvantitativní změny bazální membrány (BM), dále změny povrchového epitelu dýchacích cest a zánětlivá celulizace lamina propria mucosae (počet buněk na jednotku plochy). Šířka bazální membrány byla hodnocena na řezech barvených hematoxylinem-eozinem. Obraz byl snímán ze světelného mikroskopu (Olympus BX53) pomocí CCD kamery (ProgRes C5, Jenoptik) a hodnocen v software pro počítačovou analýzu obrazu (NIS Elements AR, Laboratory Imaging). Metodika měření bazální membrány byla shodná s dříve publikovanými doporučeními [Payne DN. et al., 2003], [Sullivan P. et al., 1998] – na reprezentativní části bazální membrány bylo provedeno alespoň 40 různých měření v rozestupu alespoň 20 µm.

Kvalitativní změny bazální membrány (zastoupení strukturálních proteinů kolagenu IV a lamininu) byly hodnoceny pomocí imunohistochemického průkazu. Kolagen IV byl detekován pomocí primární polyklonální králičí protilátky proti lidskému kolagenu IV (ab6586, Abcam, Cambridge, Spojené království) v ředění 1 : 500. Laminin byl prokazován primární polyklonální králičí protilátkou proti lidskému lamininu (L9393, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v ředění 1 : 50. V obou případech byly přes noc vzorky inkubovány s primární protilátkou při teplotě 4°C. Následně byl použit kit pro imunohistochemickou detekci (EXPOSE rabbit-specific HRP/DAB detection IHC kit, Abcam) používající k vizualizaci vazby antigenu a protilátky sekundární kozí protilátku proti králičímu imunoglobulinu G (IgG) značenou křenovou peroxidázou (HRP), jež v přítomnosti substrátu oxiduje diaminobenzidin (DAB) v hnědé nerozpustné barvivo. Jádra buněk byla dobarvena hematoxylinem. Měření vrstvy kolagenu IV a lamininu bylo provedeno stejnou metodikou jako v případě celé bazální membrány. Celulizace lamina propria mucosae byla zhodnocena při 40-násobném zvětšení na preparátu barveném hematoxylinem-eozinem spočítáním jader všech buněk. Jejich počet byl vztažen na plochu analyzovaného úseku lamina propria. Z důvodu omezeného množství tkáně (řezů pro analýzu) byl typ zánětlivé celulizace hodnocen pouze orientačně při stonásobném zvětšení (imerzní technika). Specifický průkaz jednotlivých buněčných typů nebyl proveden. Paralelně s hodnocením strukturálních změn ve

sliznici dýchacích cest byl analyzován i buněčný rozpočet z bronchoalveolární laváže. Technika odběru odpovídala mezinárodním doporučením [De Blic J. et al., 2000], jednotlivé typy buněk byly diferencovány po nabarvení technikou May-Grünwald a Giemsa-Romanowski, výsledky byly udány jako procentuální zastoupení jednotlivých buněčných typů vzhledem k celkovému počtu.

### 5.3. Statistická analýza

Základní studijní soubor představuje 109 pacientů, kteří podstoupili funkční vyšetření plic, a byly od nich odebrány relevantní anamnestické údaje. Statistická analýza pak byla provedena na souboru 95 pacientů, u kterých byly k dispozici výsledky alespoň 2 metod iPFT.

Výsledky funkčního vyšetření jsou udávány jednak v absolutních číslech, jednak jako % normy případně z-skóre. Z-skóre bylo spočteno podle vztahu:

$$z - \text{skóre} = \frac{x - \mu}{\sigma},$$

kde  $x$  značí naměřenou hodnotu parametru,  $\mu$  jeho průměr v referenční populaci a  $\sigma$  jeho směrodatnou odchylku v referenční populaci. V případě vyjádření parametrů jako z-skóre byl za normální rozmezí považován interval  $\pm 2$  směrodatné odchylky ( $\sigma$ ), který pokrývá  $\sim 95$  % populace. Výjimkou byly parametry tPTEF/tE a V'maxFRC, u kterých je klinicky významné pouze jejich snížení pod  $-2 \sigma$ . V případě parametru  $R_{aw}$  bylo použito relativní vyjádření v % normy, jelikož nejsou k dispozici data umožňující spočítat z-skóre. Za klinicky významné bylo považováno pouze zvýšení  $R_{aw}$  nad 145 % ( $\sim +2 \sigma$ ).

Intraindividuální variabilita měření byla posuzována na základě koeficientu variability (CV). Tento parametr byl vypočítán podle vztahu:

$$CV [\%] = 100 \cdot \frac{s_x}{\bar{x}},$$

kde  $s_x$  značí směrodatnou odchylku opakovaných měření a  $\bar{x}$  značí průměr opakovaných měření. Interindividuální variabilita měření byla hodnocena pomocí parametru koeficient opakovatelnosti (CR), který byl vypočten ze vztahu:

$$CR = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma,$$

kde  $\sigma$  značí směrodatnou odchylku měření daného parametru v hodnoceném souboru pacientů.

Veškeré statistické výpočty byly provedeny v software Statistika 12 CZ. V první fázi byl posouzen charakter rozložení dat. K tomuto účelu byl využit jednak Kolmogorovův-Smirnovův test a dále pak detekce těžkých chvostů („heavy tails“). Pokud nebyly v souboru

naměřených dat přítomny odlehlé chvosty, bylo aproximováno normální rozložení dat. Výsledky byly vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka a k výpočtům byly použity parametrické testy (t-test, pro závislé vzorky párový t-test, pro porovnání proměnné mezi více skupinami analýza rozptylu – ANOVA atd.) [Rasch D. et al., 2007]. V opačném případě byla data vyjádřena jako medián a rozmezí a použity neparametrické testy (Mann-Whitney, resp. Kruskal-Wallis). Porovnání kategorických proměnných mezi dvěma klinicky definovanými skupinami s normálním rozdělením dat bylo provedeno pomocí testu rozdílu dvou podílů.

Shoda měření vybraných funkčních parametrů ( $FRC_{box} \leftrightarrow FRC_{N2} \leftrightarrow FRC_{SF6}$ ;  $LCI_{2,5N2} \leftrightarrow LCI_{2,5SF6}$ ;  $R_{aw} \leftrightarrow R_{rs}$ ) byla studována na celém studijním souboru pomocí Bland-Altmanovy analýzy [Altman DG., Bland, JM., 1983] a vyjádřena odpovídajícím grafem s vyznačeným 95% intervalem shody a podílem pacientů ležících v tomto intervalu. Vzájemný vztah vybraných funkčních parametrů byl popsán Spearmanovým korelačním koeficientem (r). Hladina významnosti (p) všech statistických testů byla nastavena na 0,05.

Senzitivita, specifická, negativní a pozitivní prediktivní hodnota různých parametrů funkce plic pro riziko rozvoje asthma bronchiale dle API byla spočtena podle následujících vzorců:

$$\text{senzitivita} = \frac{TP}{TP+FN},$$

$$\text{specifická} = \frac{TN}{TN+FP},$$

$$\text{pozitivní prediktivní hodnota} = \frac{TP}{TP+FP},$$

$$\text{negativní prediktivní hodnota} = \frac{TN}{TN+FN}.$$

Vysvětlení zkratk je uvedeno v následující tabulce 5.3.1.

Tab. 5.3.1. Tabulkové znázornění výpočtu senzitivity, specifické, negativní a pozitivní prediktivní hodnoty.

|        |   | skutečnost               |                          |
|--------|---|--------------------------|--------------------------|
|        |   | +                        | -                        |
| měření | + | skutečná pozitivita (TP) | falešná pozitivita (FP)  |
|        | - | falešná negativita (FN)  | skutečná negativita (TN) |

## 6. Výsledky

Do studie bylo zařazeno 109 nespolupracujících pacientů, u kterých bylo provedeno iPFT. V rámci sledování vývoje funkčního nálezu bylo u 15 pacientů vyšetření provedeno dvakrát, u 2 pacientů třikrát a u 3 pacientů čtyři či vícekrát. Celkem tedy bylo provedeno 139 měření. To představuje zhruba 2/3 všech vyšetření provedených v naší laboratoři v období od února 2014 do února 2019. U 19 pacientů byla též v rozmezí do 14 dnů od vyšetření funkce plic provedena bronchoskopie s bronchoalveolární laváží a odběrem endobronchiální biopsie.

### 6.1. Bezpečnost a proveditelnost iPFT

Proveditelnost vyšetření byla dána jednak možností navodit kvalitní sedaci dítěte a dále pak technickou náročností jednotlivých vyšetření. Problémy se sedací se vyskytly u 12,8 % pacientů. U těchto dětí nebyl ani po podání maximálních dávek chloralhydrátu a midazolamu v rozmezí 1 hodiny dosažen dostatečně kvalitní a dlouhý spánek tak, aby mohly být provedeny alespoň 2 metody funkčního vyšetření. U jedné pacientky se objevila paradoxní reakce v.s. na midazolam. Navození adekvátního spánku bylo náročnější v krajních věkových kategoriích – tedy u dětí pod 12 týdnů věku a nad 18 měsíců. Celkem se tedy podařilo získat funkční data ze 126 měření u 95 pacientů (48x CF, 28x AB, 9x CDH, 7x chILD a 3x PCD). Klinické charakteristiky pacientů s dostupnými výsledky funkčního vyšetření plic se nelišily od celého souboru pacientů začleněných do studie ( $n = 109$ ) – všechny p-hodnoty byly vyšší než 0,05 (konkrétní data porovnání nejsou uvedena).

Nejvyšší úspěšnost vyšetření byla u analýzy klidové dechového vzoru – 89,5 %. Hlavními limitacemi této metody byly nedostatečná tolerance obličejové masky a nepravidelný klidový dechový vzor. Oba problémy byly významně závislé na dostatečné hloubce sedace dítěte. O něco nižší úspěšnost vyšetření byla zaznamenána u bodyplety smografie (82,1 %) a testu vícedechového vyplavování inertního plynu z plic (v případě dusíkové varianty 81,1 %, u hexafluoridu síry 79,2 %). Obě techniky vyžadují kromě pravidelného klidového dechového vzoru i zcela bezchybnou těsnost systému. Kritický je zejména kontakt masky s obličejem. V případě testu MBW vede sebemenší netěsnost k nadhodnocení hodnoty FRC a zkreslení nehomogenity ventilace. V případě bodyplety smografického měření je 100% těsnost systému též klíčová pro stanovení FRC během uzávěru dýchacích cest. Dalším problematickým momentem měření je samotná okluze dýchacích cest, jelikož působí rušivě na spánek dítěte, což může vést při nedostatečné sedaci k úplnému probuzení dítěte a tedy přerušení měření. Technika měření pružných vlastností

dýchacího traktu je ještě náročnější, jelikož je při ní nutné vybudit Hering-Breuerův inflační reflex. K tomu je zapotřebí dosáhnout uzávěru dýchacích cest na konci nádechu trvajících 100 ms. Následně musí být přítomen dostatečně dlouhý pasivní výdech (tj. deflace dýchacího traktu pouze na základě jeho mechanických vlastností), aby bylo možno stanovit časovou konstantu dýchacího traktu. V případě vysoké dechové frekvence či nepravidelného dechového vzoru se toto nedaří a vyšetření je nutno odmítnout. Výsledná úspěšnost této techniky byla 76,8 %. Metoda torakoabdominální komprese pak měla vzhledem ke své největší technické náročnosti nejnižší úspěšnost. Reprodukovatelná maximální křivka průtok-objem byla získána v 66,3 %. Limitací je jednak nutnost dostatečně dlouhého výdechu, který umožní spolehlivě analyzovat výdechové raménko usilovné FV křivky a určit hodnotu parametru  $V'_{maxFRC}$  (čili aktuální průtok na úrovni EEL resp. FRC). Dále je třeba dosáhnout průtokové limitace, čili situace, kdy již nedochází k nárůstu výdechových průtoků i přes zvyšující se řídící tlaky vestičky. Torakoabdominální kompresi je tedy nutno několikrát zopakovat (obvykle 5 – 8krát). V neposlední řadě je třeba brát do úvahy fakt, že se vyšetření TV-RTC provádí v protokolu jako poslední v pořadí (viz možnost ovlivnění výsledků dalších metod kompresí hrudníčku – [Subbarao P. et al., 2016]). V důsledku toho bývá úroveň sedace již nižší a snáze dojde k předčasnému probuzení dítěte.

Pro dosažení technicky akceptovatelného vyšetření obecně je třeba věnovat i patřičnou pozornost správnému napolohování dítěte a optimálnímu umístění obličejové masky. V opačném případě dochází k problémům s hodnocením odporu dýchacích cest, který je velmi ovlivněn anatomii horních cest dýchacích. Zde je třeba zmínit i úskalí příliš hluboké sedace, která může vést – krom hypoventilace – i k významnému snížení stability měkkých částí horních cest dýchacích (zejména oropharyngu) při povšechné hypotonii. To má za následek variabilní obstrukci extratorakálních dýchacích cest projevující se v inspiriu. Výsledné bizarní tvary klidové křivky průtok-objem a křivky tlak-průtok (hysterezní smyčky bodyplety-smograficky měřeného odporu dýchacích cest) nelze spolehlivě hodnotit.

Úspěšnost vyšetření se mezi jednotlivými diagnostickými skupinami lišila jen mírně. Výjimku tvořila pouze skupina dětí s intersticiálními plicními procesy, u kterých bylo z celkového pohledu registrováno nejvýraznější plicní postižení s vysokou dechovou frekvencí a nepravidelným dechovým vzorem. U tří dětí byly dokonce zaznamenány významné desaturace s nutností přerušení vyšetření a krátké oxygenoterapie (viz dále). Tyto aspekty podstatně snižovaly úspěšnost všech měření.

Analýza nežádoucích epizod zaznamenaných v rámci měření ukázala vysokou bezpečnost metodiky iPFT. U žádného z pacientů nedošlo k apnoické pauze, významné

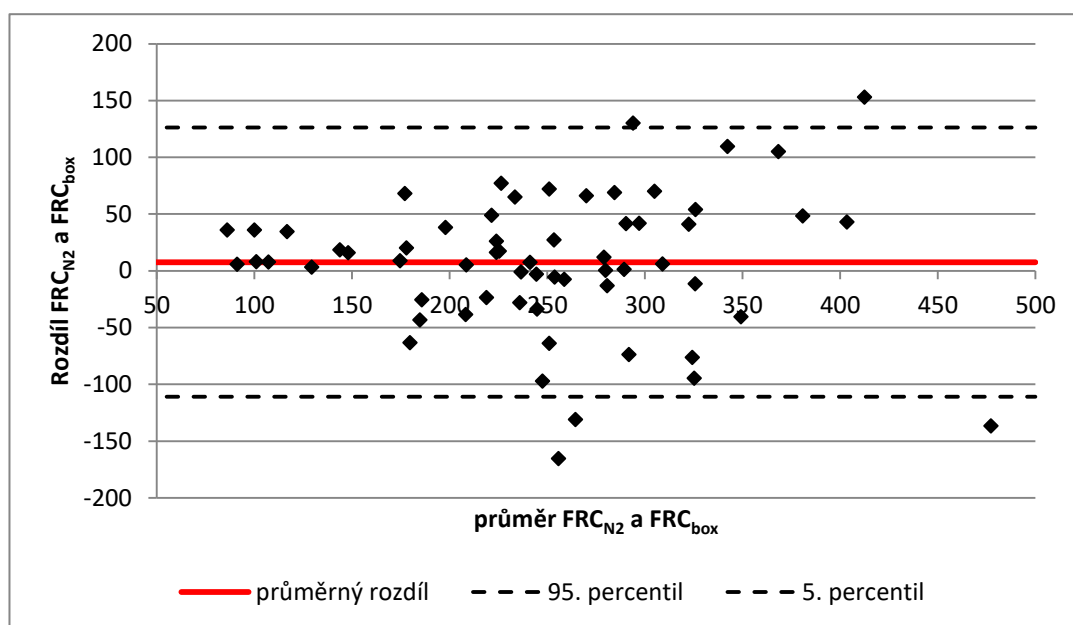


hypoventilaci ani bradykardii, tak jak byly definovány v kapitole 5.2.3. Vyšetření funkce plic Významné desaturace se vyskytly u 3 pacientů s intersticiálním plicním procesem (tito pacienti však byli na dlouhodobé domácí oxygenoterapii aplikované ve spánku), jednoho pacienta s CF a jednoho s opakovanými obstrukčními epizodami. V celkovém počtu úspěšně provedených vyšetření to činí méně než 5 %. Závažnost těchto epizod byla nízká, po sejmutí obličejové masky a napolohování došlo zpravidla k rychlému vzestupu saturací, pouze u 3 pacientů s chILD byla nutná podpůrná nízkoprůtoková oxygenoterapie trvající několik málo minut. Krom pacientů s chILD se tedy velmi pravděpodobně jednalo o přechodnou částečnou obstrukci dýchacích cest nikoliv o v literatuře raritně zmiňovaný efekt chloralhydrátu [Mallol J., Sly PD., 1988]. V souvislosti s metodou torakoabdominální komprese bývá zmiňováno i riziko aspirace. Z tohoto důvodu je vyšetření prováděno u lačných dětí. Ačkoliv detailní data k hodnocení těchto nežádoucích epizod nebyla sbírána, nesetkali jsme se během provedených vyšetření s žádnou situací klinicky imponující jako gastroezofageální reflux případně aspirace.

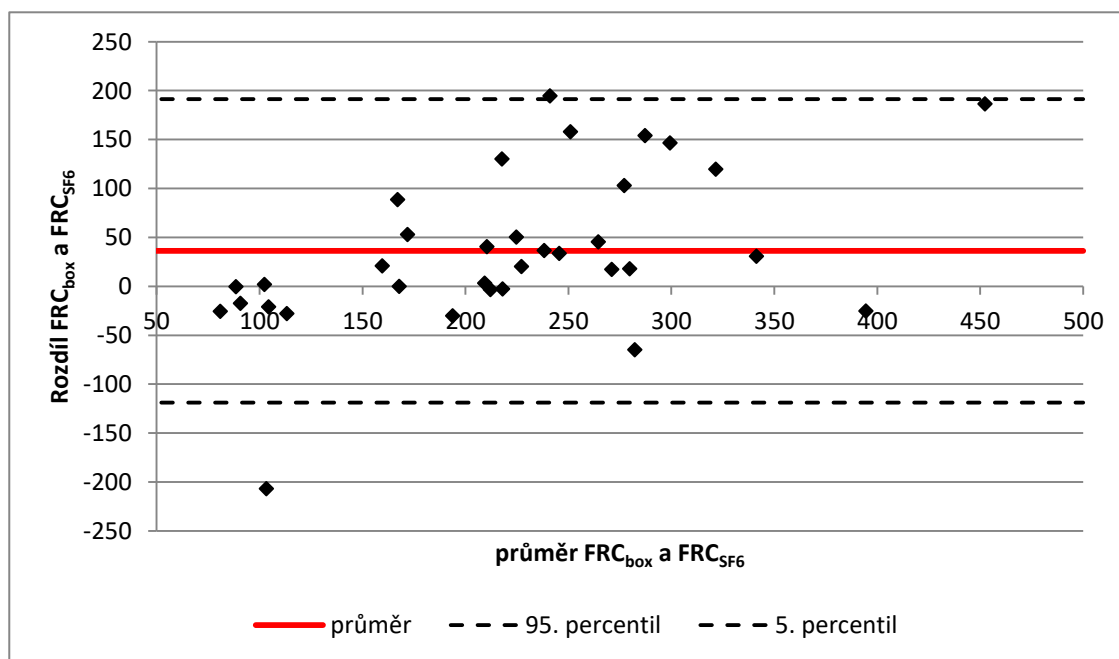
## 6.2. Vzájemný vztah mezi vybranými parametry funkce plic

Funkční reziduální kapacita byla v naší studii stanovena 3 způsoby – bodypletygmograficky ( $FRC_{box}$ ) a dvěma dilučními testy (dusíkový washout –  $FRC_{N_2}$ , hexafluoridový washout –  $FRC_{SF_6}$ ). K dispozici bylo 62 párových měření  $FRC_{box}$  a  $FRC_{N_2}$ . Hodnota z dusíkového washoutu byla v průměru o 7,6 ml (0,50 ml/kg) vyšší než z bodypletygmografického měření. Tento rozdíl nebyl statisticky významný ( $p = 0,327$ ). Bland-Altmanova analýza ukázala uspokojivou shodu mezi těmito dvěma způsoby měření  $FRC$ , jen u 5 pacientů (8,1 %) ležely hodnoty mimo 95% interval spolehlivosti (-7,8; 23,1) – graf 6.2.1. Vzájemné porovnání dilučních metod ( $FRC_{N_2}$  a  $FRC_{SF_6}$ ) bylo k dispozici u 38 pacientů. Dusíkový washout stanovil hodnotu  $FRC$  signifikantně vyšší než hexafluoridový washout ( $p < 0,001$ ).  $FRC_{N_2}$  bylo v průměru o 23,4 ml (3,13 ml/kg) vyšší než  $FRC_{SF_6}$ , 95% interval spolehlivosti byl (18,0; 28,7). Bland-Altmanův graf však ukazuje vysokou shodu mezi těmito metodami (2 měření leží mimo 95% interval spolehlivosti) – graf 6.2.2. Porovnání bodypletygmografické metody a hexafluoridového washoutu bylo provedeno u 33 pacientů,  $FRC_{box}$  převyšovalo  $FRC_{SF_6}$  v průměru o 43,6 ml tzn. 3,98 ml/kg,  $p < 0,001$ , 95% interval spolehlivosti byl (19,2; 68,0). Hodnoty u 2 pacientů (6,1 %) ležely mimo 95% interval spolehlivosti na Bland-Altmanově grafu (graf 6.2.3). Rozdíl mezi  $FRC_{box}$  a  $FRC_{N_2}$  signifikantně koreloval s parametrem  $LCI_{2,5N_2}$  ( $r = 0,530$ ,  $p < 0,001$ ). V případě rozdílu

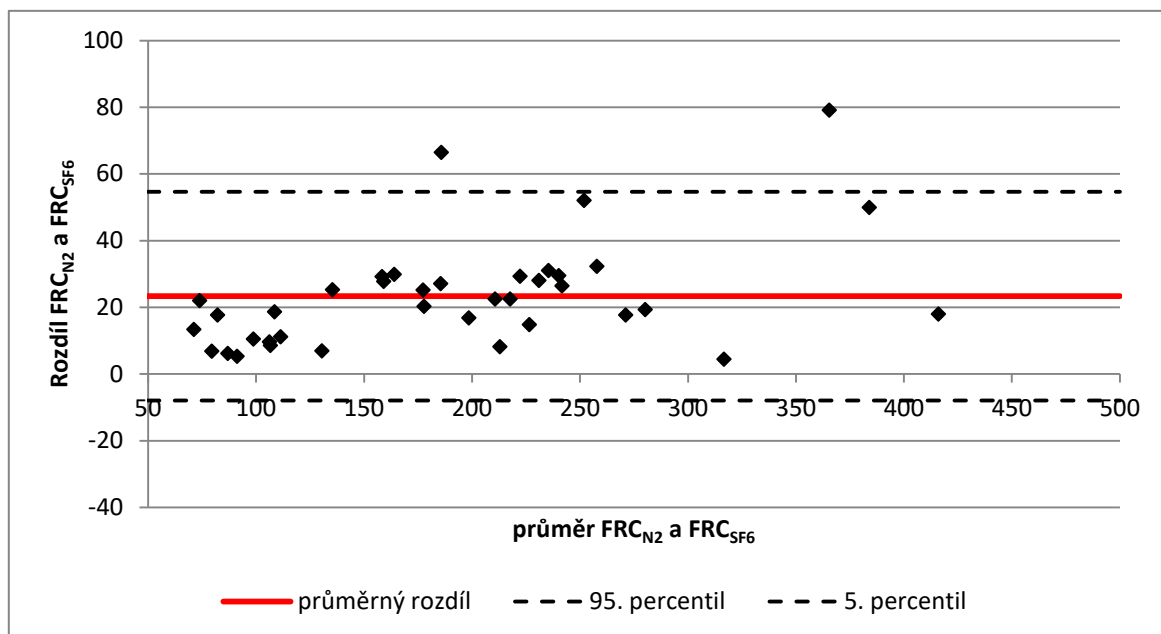
$FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{\text{SF6}}$  byla nalezena jeho závislost na parametrech  $LCI_{2,5\text{SF6}}$  ( $r = 0,691$ ,  $p < 0,001$ ) a  $C_{\text{TS}}$  z-skóre ( $r = -0,640$ ,  $p = 0,002$ ). Mezi parametry  $FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{\text{N2}}$  v celém studijním souboru byla pozorována signifikantní korelace ( $r = 0,758$ ,  $p < 0,001$ ). Ještě vyšší stupeň korelace byl nalezen mezi  $FRC_{\text{N2}}$  a  $FRC_{\text{SF6}}$  ( $r = 0,987$ ,  $p < 0,001$ ).



Graf 6.2.1. Vztah mezi parametry  $FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{\text{N2}}$  – Bland-Altmanův graf

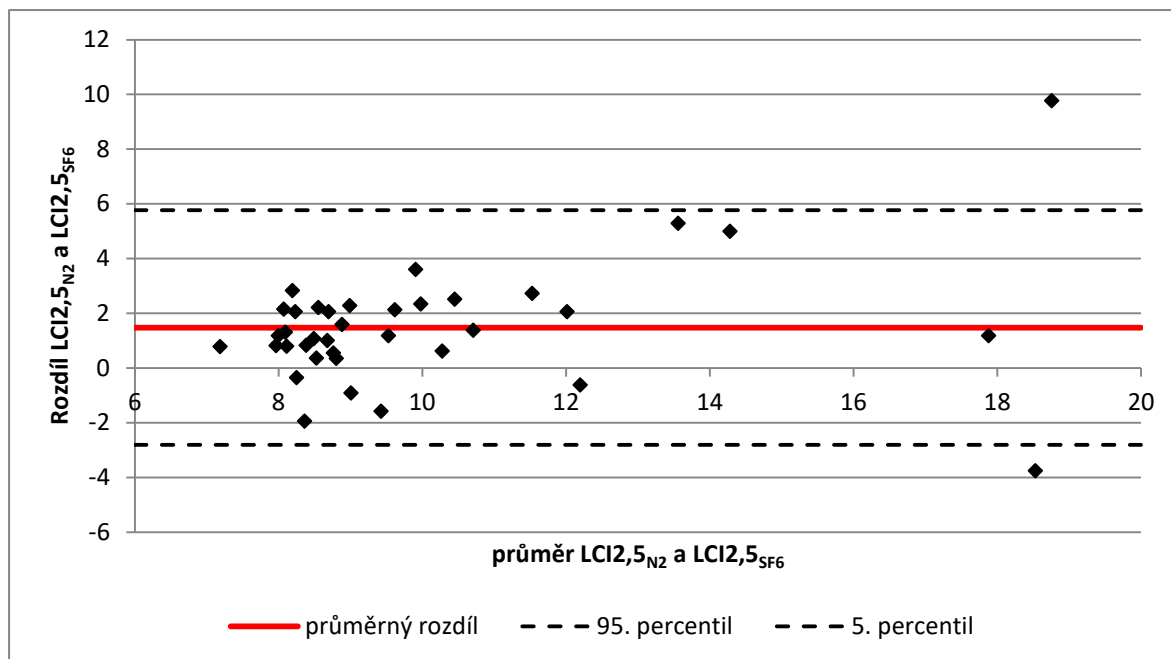


Graf 6.2.2. Vztah mezi parametry  $FRC_{\text{SF6}}$  a  $FRC_{\text{N2}}$  – Bland-Altmanův graf



Graf 6.2.3. Vztah mezi parametry  $FRC_{SF6}$  a  $FRC_{box}$  – Bland-Altmanův graf

V rámci dalšího porovnání metody  $N_2$ -MBW a  $SF_6$ -MBW byl hodnocen vztah očišťovacího indexu plic ( $LCI_{2,5}$ ) z dusíkového a hexafluoridového washoutu. Hodnoty  $LCI_{2,5}$  stanovené metodou  $N_2$ -MBW byly v průměru o 1,48 jednotky vyšší než  $SF_6$ -MBW,  $p < 0,001$ , 95% interval spolehlivosti (0,72; 2,17). Pouze u 6 pacientů (15,8 %) bylo  $LCI_{2,5SF6}$  vyšší než  $LCI_{2,5N2}$ . Stupeň shody obou metod je znázorněn v grafu 6.2.4. Pouze 2 pacienti leží mimo 95% interval spolehlivosti. Korelace mezi  $LCI_{2,5SF6}$  a  $LCI_{2,5N2}$  dosahovala statistické významnosti ( $r = 0,766$ ,  $p < 0,001$ ). Rozdíl mezi  $LCI_{2,5N2}$  a  $LCI_{2,5SF6}$  koreloval s  $FRC_{box}$  z-skóre ( $r = 0,612$ ,  $p = 0,005$ ),  $LCI_{2,5N2}$  ( $r = 0,968$ ,  $p < 0,001$ ) a  $LCI_{2,5SF6}$  ( $r = 0,827$ ,  $p < 0,001$ ). Těsný vztah byl pozorován mezi  $LCI_{2,5}$  a  $LCI_5$  jak v případě dusíkového ( $r = 0,867$ ,  $p < 0,001$ ), tak hexafluoridového ( $r = 0,982$ ,  $p < 0,001$ ) washoutu.

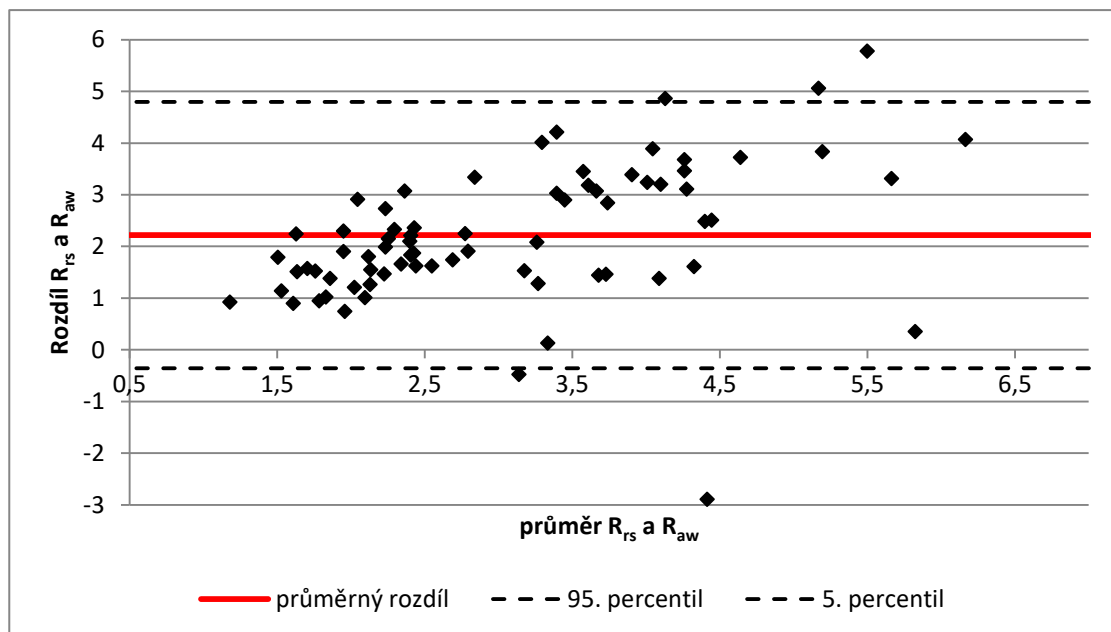


Graf 6.2.4. Vztah mezi parametry  $LCI_{2,5SF6}$  a  $LCI_{2,5N2}$  – Bland-Altmanův graf

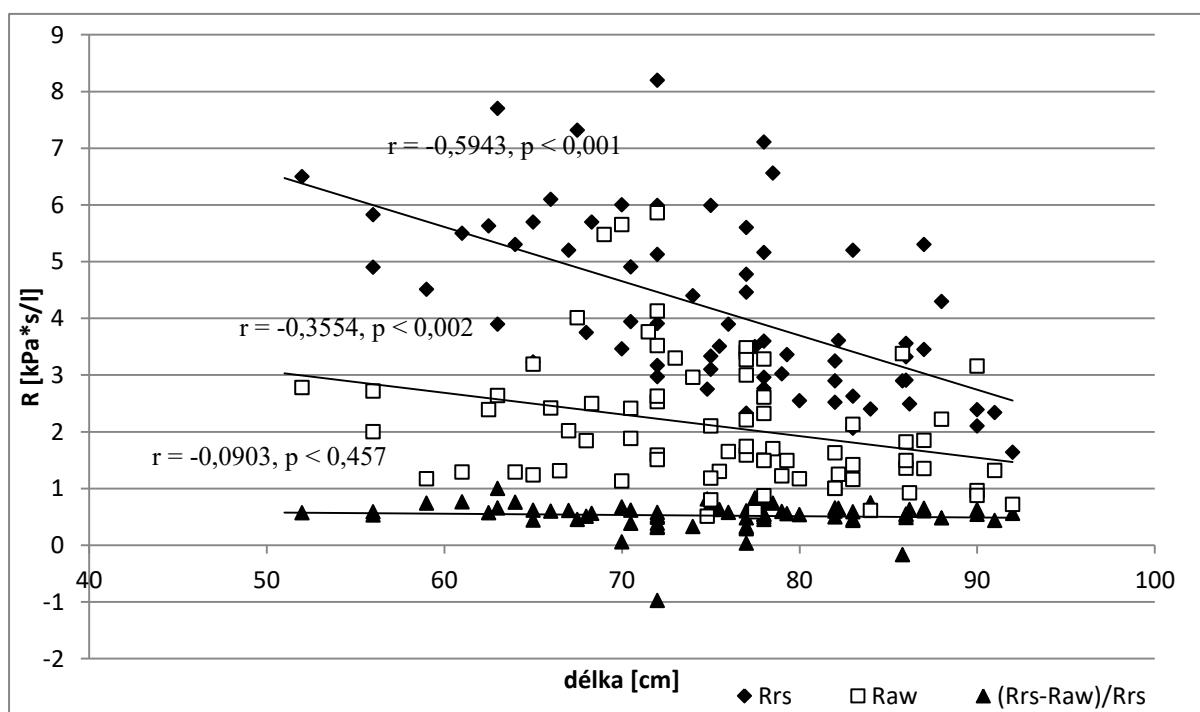
Korelace parametru  $LCI_{2,5N2}$  s výstupními parametry dalších metod iPFT byla signifikantní pouze v případě z-skóre parametrů  $FRC_{box}$  ( $r = 0,470$ ,  $p < 0,001$ ) a  $C_{rs}$  ( $r = -0,31$ ,  $p = 0,035$ ). Pokud byly parametry  $C_{rs}$  a  $FRC_{box}$  vyjádřeny v absolutních hodnotách, vztah signifikantní nebyl. Parametry  $V'_{maxFRC}$  z-skóre ( $r = -0,102$ ,  $p = 0,501$ ) a  $R_{aw}\%$  ( $r = 0,245$ ,  $p = 0,101$ ) s  $LCI_{2,5N2}$  nekorelovaly. Pro úplnost byla doplněna korelace parametru  $LCI_{2,5}$  s antropometrickými údaji. Ve studijním souboru nezávisel  $LCI_{2,5N2}$  ani  $LCI_{2,5SF6}$  na věku, výšce či váze. Obdobná závislost nebyla nalezena ani v případě  $LCI_{2,5SF6}$  vyjádřeného jako z-skóre.

V dalším kroku byla studována závislost mezi parametry funkce plic stanovenými klasickými metodami (BP, Tidal, RC, TV-RTC). Signifikantní korelace byla nalezena mezi absolutními hodnotami odporu dýchacího traktu (stanoveným okluzní technikou –  $R_{rs}$ ) a odporu dýchacích cest (stanoveným bodyplety smograficky –  $R_{aw}$ ). V celém souboru dosahoval Spearmanův korelační koeficient hodnoty  $r = 0,673$ ,  $p < 0,001$ . Hodnoty odporu respiračního traktu byly v průměru o 2,29 (kPa\*s/L) vyšší než odporu dýchacích cest,  $p < 0,001$ ; 95% interval spolehlivosti pro rozdíl  $R_{rs}$  a  $R_{aw}$  byl (2,01; 2,57). V celém souboru hodnota  $R_{aw}$  převyšovala  $R_{rs}$  jen u 1 pacienta (o 0,48 kPa\*s/L). Shoda obou metod je znázorněna v grafu 6.2.5. Hodnoty pouze od 5 pacientů ležely mimo 95% interval spolehlivosti. Negativní korelace byla nalezena mezi antropometrickými parametry (věk, výška, váha) a  $R_{rs}$  i  $R_{aw}$  (graf 6.2.6.). Rozdíl  $R_{rs}$  a  $R_{aw}$  vztažený k celkovému odporu dýchacího traktu ( $\frac{R_{rs}-R_{aw}}{R_{rs}}$ ) dosahoval hodnot  $52,1 \pm 25,6$  % a nezávisel na žádném

z antropometrických parametrů ( $p = 0,335$  pro věk,  $p = 0,570$  pro váhu a  $p = 0,457$  pro výšku). Odpor dýchacích cest ( $R_{aw}$ ) i celého dýchacího traktu ( $R_{rs}$ ) vztažený k normě koreloval pouze s  $FRC_{box}$  z-skóre (pro  $R_{rs}$ :  $r = 0,354$ ,  $p = 0,002$ , pro  $R_{aw}$ :  $r = 0,307$ ,  $p = 0,006$ ), s dalšími parametry ( $tPTEF/tE$  z-skóre,  $C_{rs}$  z-skóre a  $V'_{maxFRC}$  z-skóre) nikoliv.



Graf 6.2.5. Vztah mezi parametry  $R_{rs}$  a  $R_{aw}$  – Bland-Altmanův graf



Graf 6.2.6. Závislost parametrů  $R_{rs}$ ,  $R_{aw}$  a  $(R_{rs}-R_{aw})/R_{rs}$  na délce.

### 6.3. Porucha funkce plic u jednotlivých skupin pacientů a její klinická relevance

#### *Opakované obstrukční epizody*

Význam vyšetření funkce plic při hodnocení rizika rozvoje astmatu u dětí s opakovanými obstrukčními epizodami byl posuzován na základě porovnání 11 pacientů s pozitivním (API+) a 17 s negativním (API-) indexem klinického rizika astmatu. Základní antropometrické charakteristiky podskupin jsou uvedeny v tabulce 6.3.1., jejich klinické charakteristiky pak v tabulce 6.3.2. Mezi skupinami byl signifikantní rozdíl v počtu obstrukčních epizod za rok, výskytu atopického ekzému a parentálního astmatu.

Tab. 6.3.1. Antropometrické a perinatální údaje pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami a dostupným funkčním vyšetřením, rozděleno podle positivity Asthma Predictive Index.<sup>11</sup>

|                          | API+<br>(n = 11) | API-<br>(n = 17) | Porovnání API+ a<br>API- (p hodnota) |
|--------------------------|------------------|------------------|--------------------------------------|
| Muži (%)                 | 9 (81,8)         | 13 (76,5)        | 0,200†                               |
| Věk [týdny]              | 68,8 ± 36,4      | 58,1 ± 27,7      | 0,404                                |
| Délka [cm]               | 78,1 ± 8,8       | 74,5 ± 6,9       | 0,257                                |
| Délka z-skóre            | -0,41 ± 1,40     | -0,81 ± 0,68     | 0,335                                |
| Hmotnost [kg]            | 10,6 ± 2,4       | 9,8 ± 1,9        | 0,355                                |
| Hmotnost z-skóre         | -0,09 ± 0,90     | -0,28 ± 0,88     | 0,605                                |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ] | 17,2 ± 1,5       | 17,5 ± 1,3       | 0,599                                |
| BMI z-skóre              | 0,32 ± 1,04      | 0,42 ± 0,78      | 0,787                                |
| Prematurita < 37+0 g.t.  | 3 (27,3)         | 6 (35,2)         | 0,662†                               |
| Porodní hmotnost [g]     | 3036 ± 457       | 2982 ± 477       | 0,788                                |
| Porodní délka [cm]       | 49,0 ± 1,3       | 48,1 ± 1,6       | 0,207                                |

<sup>11</sup> Porovnání charakteristik mezi skupinami API+ a API- bylo provedeno pomocí t-testu, pouze p-hodnoty označené † pocházející z testu rozdílu dvou podílů.

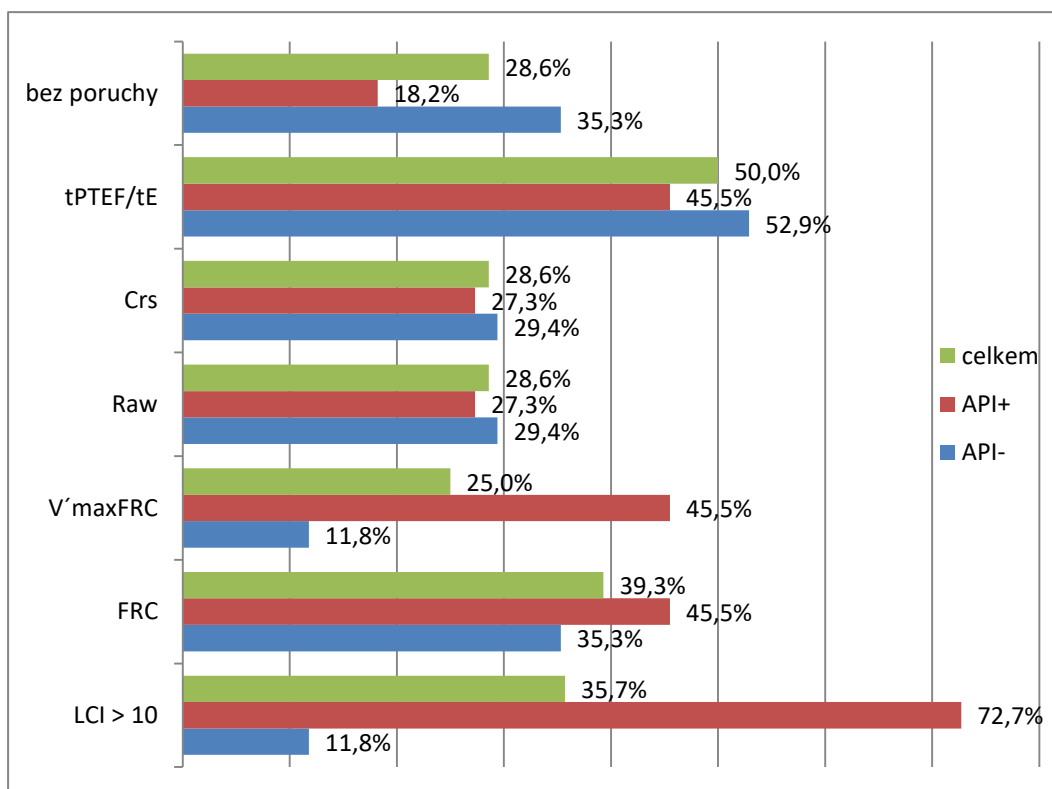
Tab. 6.3.2. Klinické charakteristiky podskupin API+ a API- pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami a úspěšným vyšetřením funkce plic.<sup>12</sup>

|   | Celkově<br>(n = 28) | API+<br>(n = 11) | API-<br>(n = 17) | Porovnání<br>API+ a API-<br>(p hodnota) |
|---|---------------------|------------------|------------------|---|
| <b>Počet obstrukčních epizod za rok</b> | <b>3,32</b>         | <b>3,97</b>      | <b>2,90</b>      | <b>0,046</b>                            |
| <b>Astma u rodičů</b>                   | <b>13 (46,4)</b>    | <b>9 (81,8)</b>  | <b>4 (23,5)</b>  | <b>0,003†</b>                           |
| <b>Atopický ekzém u pacienta</b>        | <b>4 (14,3)</b>     | <b>4 (36,4)</b>  | <b>0 (0,0)</b>   | <b>0,007†</b>                           |
| Obstrukční epizody mimo infek           | 13 (46,4)           | 7 (63,6)         | 6 (35,3)         | 0,143†                                  |
| Alergická rhinitis u pacienta           | 1 (3,6)             | 1 (9,0)          | 0 (0,0)          | 0,208†                                  |
| Periferní eozinofilie                   | 352 (3,2)           | 486 (4,2)        | 265(2,5)         | 0,287                                   |

Vyšetření iPFT ukázalo podstatné deficity ve funkci plic u obou podskupin, jejich procentuální zastoupení je znázorněno v grafu 6.3.1. Bez poruchy funkce plic (tzn.  $-2 < z$ -skóre  $FRC_{box} < 2$ ;  $R_{aw} < 145$  %;  $-2 < C_{rs}$  z-skóre  $< 2$ ;  $tPTEF/tE$  z-skóre  $> -2$ ;  $LCI_{2,5N_2} < 10,0$ ;  $V'_{maxFRC}$  z-skóre  $> -2$ ) bylo pouze 35,3 % pacientů z podskupiny API-, v podskupině API+ to bylo 18,2 %, tento rozdíl však nedosáhl statistické významnosti ( $p = 0,328$ ). Mezi nejčastější poruchy funkce plic patřil aktivní výdech jako nepřímá známka obstrukce periferních dýchacích cest (cca 50 % případů) a hyperinflace plic (z-skóre  $FRC_{box} > 2$ ; výskyt zhruba u  $\frac{1}{3}$  všech pacientů). Ani v případě těchto konkrétních poruch však nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi oběma podskupinami. Významné meziskupinové rozdíly byly ale nalezeny v parametru  $LCI_{2,5N_2}$  ( $9,3 \pm 1,1$  v API- skupině a  $13,1 \pm 2,3$  v API+ podskupině,  $p < 0,001$ ) a  $V'_{maxFRC}$  z-skóre ( $-1,2 \pm 0,6$  v API- a  $-2,1 \pm 1,1$  v API+,  $p = 0,046$ ). Relativní zastoupení abnormálních nálezů těchto parametrů (tzn.  $LCI_{2,5N_2} > 10,0$  a  $V'_{maxFRC}$  z-skóre  $< -2,0$ ) se mezi podskupinami API- a API+ také lišilo. V případě  $LCI_{2,5N_2}$  to bylo 11,8 % vs. 72,7 %,  $p = 0,001$  a v případě  $V'_{maxFRC}$  to bylo 11,8 % vs. 45,5 %,  $p = 0,044$ . Na základě zastoupení hodnot  $LCI_{2,5N_2} > 10,0$  mezi pacienty z API+ a API- podskupiny byla vypočítána senzitivita (72,7 %), specificita (76,5 %), pozitivní (66,7 %) a negativní (81,3 %) prediktivní hodnota tohoto parametru pro riziko rozvoje astmatu posuzovaného dle API. Obdobně byly spočteny tyto charakteristiky pro parametr  $V'_{maxFRC}$  z-skóre  $< -2,0$ : senzitivita 71,4 %,

<sup>12</sup> Porovnání charakteristik mezi skupinami API+ a API- bylo provedeno pomocí t-testu, pouze p-hodnoty označené † pocházející z testu rozdílu dvou podílů.

specifická 13,3 %, pozitivní prediktivní hodnota 45,5 %, negativní prediktivní hodnota 18,2 %.



Graf 6.3.1. Zastoupení abnormálních nálezů jednotlivých parametrů funkce plic v celé skupině pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami a jejich podskupinách (API+ a API-)

### Cystická fibróza

U pacientů s cystickou fibrózou byla v souvislosti s vyšetřením iPFT zhodnocena řada anamnestických údajů charakterizujících průběh onemocnění. Pankreaticky suficientních bylo pouze 6,3 % všech pacientů souboru, mekoniový ileus byl diagnostikován u 16,7 %. Porucha výživy se vyskytovala u 22,9 % pacientů, porucha růstu u 6,3 %. Genotyp a zastoupení jednotlivých mutací u všech vyšetřených pacientů (n = 55) shrnují grafy 5.1.1. a 5.1.2. v sekci Metodika (kapitola 5.1. Pacienti). Intermitentní kolonizace *Staphylococcus aureus* byla zachycena u 29,2 % pacientů, chronická kolonizace obdobně tak u 29,2 %, bez kolonizace *Staphylococcus aureus* bylo 25,0 % (u zbylých 16,6 % dětí nebyl dostatek vzorků k hodnocení záchyty). Intermitentní kolonizace *Pseudomonas aeruginosa* byla zaznamenána u 20,8 % pacientů (skupina *PsA+*), chronická se v souboru nevyskytla. Dvacet pět procent pacientů souboru nemělo žádnou ze sledovaných kolonizací. Alespoň jednu těžkou exacerbaci prodělalo 25 % CF pacientů v souboru. Vztaheno na dobu sledování to odpovídá v průměru 0,43 těžké exacerby za rok. Lehkých exacerbací prodělal v průměru každý pacient 1,09 za



rok (rozmezí 0,44 – 4,48/rok). Zcela bez exacerbací (lehkých i těžkých) bylo 37,5 % pacientů. Počet dní na perorálních antibioticích byl v celém souboru 25,25 za rok, na intravenózních ATB pak 6,51 za rok. Ve skupině pacientů s alespoň jedním záchytem *Pseudomonas aeruginosa* byly těžké exacerbace významně častější než ve skupině bez této kolonizace (výskyt u 62,5 %, resp. 17,5 % pacientů,  $p = 0,007$ ). Ve skupině *PsA*+ nebyl žádný pacient, který by neprodělal alespoň jednu exacerbaci (ať lehkou či těžkou), ve skupině *PsA*- jich bylo 45 % ( $p = 0,016$ ). Obdobně tak ve skupině *PsA*+ byla signifikantně častější porucha růstu než ve skupině *PsA*- (50 % vs. 5 %,  $p < 0,001$ ). V případě poruchy výživy tento rozdíl nalezen nebyl. U pacientů s chronickou kolonizací *Staphylococcus aureus* nebyly těžké exacerbace signifikantně častější než ve skupině bez této chronické kolonizace (alespoň jednu těžkou exacerbaci prodělalo 44,4 %, resp. 20,5 %,  $p = 0,135$ ). Obdobně tak nebyl mezi těmito dvěma skupinami rozdíl v počtu pacientů zcela bez exacerbace a s alespoň jednou exacerbací (22,2 % vs. 41,1 %,  $p = 0,293$ ), v počtu pacientů s poruchou růstu a bez ní (11,1 % vs. 7,7 %,  $p = 0,738$ ) a počtu pacientů s poruchou výživy a bez ní (11,1 % vs. 25,6 %,  $p = 0,351$ ).

V dalším kroku jsem porovnával parametry funkce plic v podskupinách CF pacientů definovaných na základě různých klinických ukazatelů. Tímto způsobem nebyl nalezen rozdíl ve funkci plic ani v antropometrických údajích mezi dětmi pankreaticky suficientními a insuficientními, obdobně tak ani pacienti po mekoniovém ileu se signifikantně neodlišovali od pacientů, kteří tuto komplikaci neprodělali. Nenašel jsem též rozdíly ve funkci plic mezi dětmi s a bez poruchy růstu či poruchy výživy. Podle genotypu nebyly též zaznamenány významné funkční rozdíly. Funkční nález byl však významně horší u pacientů, kteří prodělali alespoň jednu těžkou exacerbaci oproti dětem bez těžké exacerbace (nezávisle na počtu lehkých exacerbací). Tyto podskupiny se lišily v parametrech:  $FRC_{\text{box}}$  z-skóre ( $\Delta = 1,75$ ; 95%CI (0,41; 3,10);  $p = 0,012$ ),  $R_{\text{aw}}$  % ( $\Delta = 65,6\%$ ; 95%CI (14,3; 116,9);  $p = 0,014$ ),  $R_{\text{rs}}$  z-skóre ( $\Delta = 1,28$ ; 95%CI (0,52; 2,04);  $p = 0,002$ ),  $LCI_{2,5N_2}$  ( $\Delta = 2,37$ ; 95%CI (0,84; 3,89);  $p = 0,003$ ),  $LCI_{2,5SF_6}$  ( $\Delta = 2,09$ ; 95%CI (0,43; 3,75);  $p = 0,016$ ) a  $LCI_{2,5SF_6}$  z-skóre ( $\Delta = 2,77$ ; 95%CI (0,73; 4,82);  $p = 0,010$ ). Rozdíl v antropometrických údajích mezi nimi nalezen nebyl. Rozdíly v plicních funkcích byly nalezeny i mezi podskupinami pacientů s různou mikrobiální kolonizací. U pacientů, kteří měli alespoň jeden kultivační záchyt *Pseudomonas aeruginosa*, bylo zjištěno vyšší  $LCI_{2,5N_2}$  ( $\Delta = 2,04$ ; 95%CI (0,33; 3,74);  $p = 0,020$ ) i  $LCI_{2,5SF_6}$  ( $\Delta = 2,39$ ; 95%CI (0,06; 4,72);  $p = 0,045$ ) než u pacientů bez takového záchytu. Ostatní parametry funkce plic ani antropometrické údaje se nelišily. Pacienti s intermitentním záchytem *Staphylococcus aureus* a pacienti zcela bez záchytu této bakterie se nelišily ve funkci plic ani v antropometrických údajích. Naopak děti s chronickou kolonizací *Staphylococcus*

*aureus* měli vyšší LCI2,5<sub>N2</sub> než ti zcela bez kolonizace ( $\Delta = 2,49$ ; 95%CI (0,39; 4,60);  $p = 0,023$ ).

Ve třetím kroku byl zhodnocen vztah mezi počtem dnů ATB léčby za rok a poruchou funkce plic. Počet dní p.o. ATB/rok významně koreloval s následujícími parametry: FRC<sub>box</sub> z-skóre ( $r = 0,597$ ,  $p < 0,001$ ), R<sub>aw</sub>% ( $r = 0,492$ ,  $p = 0,003$ ), R<sub>rs</sub> z-skóre ( $r = 0,432$ ,  $p = 0,014$ ), V'maxFRC z-skóre ( $r = -0,452$ ,  $p = 0,021$ ), LCI2,5<sub>N2</sub> ( $r = 0,509$ ,  $p < 0,001$ ), LCI2,5<sub>SF6</sub> ( $r = 0,472$ ,  $p = 0,023$ ) a LCI2,5<sub>SF6</sub> z-skóre ( $r = 0,513$ ,  $p = 0,012$ ). Významná pozitivní korelace byla nalezena i s věkem ( $r = 0,646$ ,  $p < 0,001$ ). V případě počtu dní léčby i.v. ATB byl nalezen signifikantní vztah k LCI2,5<sub>SF6</sub> z-skóre ( $r = 0,462$ ,  $p = 0,027$ ) a R<sub>aw</sub>% ( $r = 0,355$ ,  $p = 0,037$ ), hraniční signifikance pak vzhledem k LCI2,5<sub>N2</sub> ( $r = 0,277$ ,  $p = 0,079$ ). Slabá, ale signifikantní korelace byla nalezena i mezi počtem dní ATB i.v./rok a věkem dítěte ( $r = 0,306$ ,  $p = 0,034$ ).

Pro orientační zhodnocení vývoje plicních funkcí dětí s CF v kojeneckém věku byly definovány 2 podskupiny – CF<sub>malí</sub> (tzn. děti do 6 měsíců věku) a CF<sub>velcí</sub> (dětí starší 6 měsíců). Jejich klinické a antropometrické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 6.3.3. Krom absolutních hodnot váhy, délky a věku při vyšetření nebyl statisticky významný rozdíl nalezen v žádném ze sledovaných parametrů. Nicméně procentuální zastoupení pacientů s poruchou výživy bylo signifikantně vyšší ve skupině CF<sub>malí</sub> než CF<sub>velcí</sub> (53,8 % vs. 11,4%,  $p = 0,002$ ).

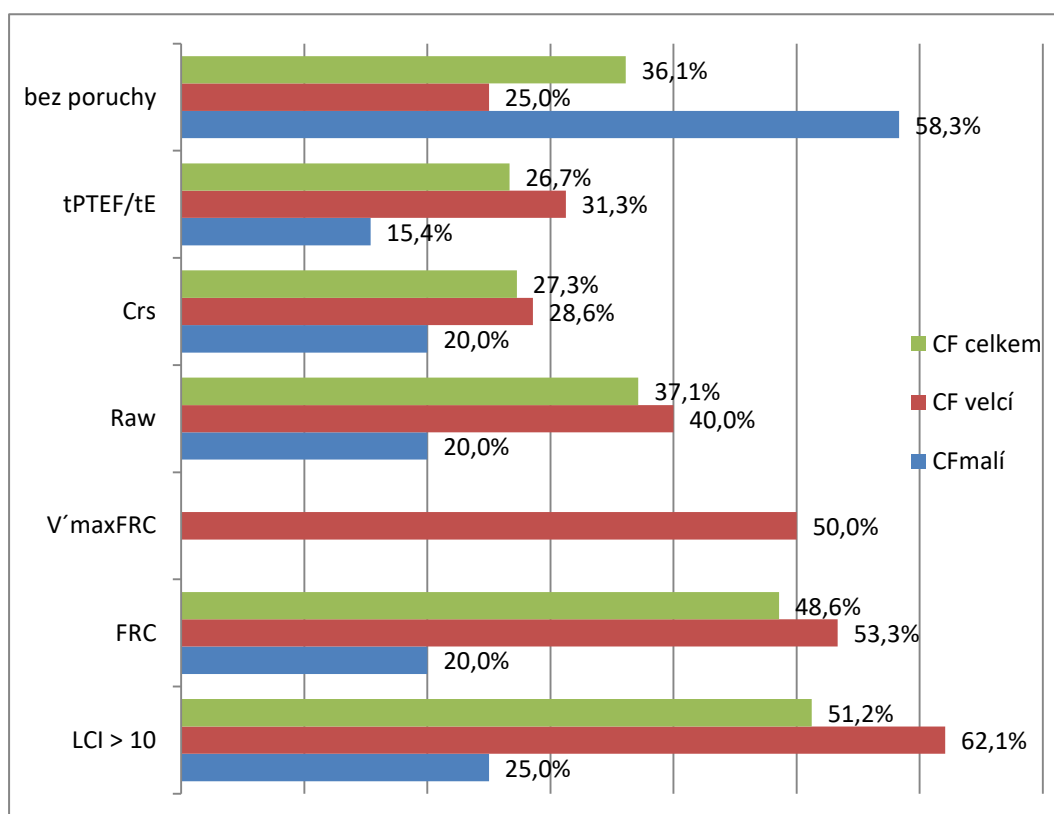
Tab. 6.3.3. Antropometrické charakteristiky CF pacientů s dostupným funkčním vyšetřením dle podskupin (CF<sub>malí</sub> a CF<sub>velcí</sub>).<sup>13</sup>

|                          |             | CF <sub>malí</sub><br>(n = 13) | CF <sub>velcí</sub><br>(n = 35) | Porovnání CF <sub>malí</sub> a CF <sub>velcí</sub> (p-hodnoty) |
|--------------------------|-------------|--------------------------------|---------------------------------|--|
| Muži (%)                 |             | 7 (53,4)                       | 14 (40,0)                       | 0,406†   |
| Věk [týdny]              |             | 8,1 ± 5,3                      | 66,5 ± 23,9                     | < 0,001  |
| Délka [cm]               |             | 55,7 ± 4,7                     | 76,9 ± 8,8                      | < 0,001  |
| Délka z-skóre            |             | -0,50 ± 0,93                   | -0,48 ± 1,41                    | 0,608  |
| Hmotnost [kg]            |             | 4,2 ± 1,2                      | 9,9 ± 2,5                       | < 0,001  |
| Hmotnost z-skóre         |             | -0,99 ± 0,86                   | -0,60 ± 1,51                    | 0,720  |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ] |             | 13,3 ± 2,0                     | 16,4 ± 1,9                      | < 0,001  |
| BMI z-skóre              |             | -0,98 ± 1,11                   | -0,19 ± 1,16                    | 0,054  |
| Prematurita < 37+0 g.t.  |             | 0 (0)                          | 5 (10,2)                        | 0,231†   |
| Porodní hmotnost [g]     |             | 3252,9 ± 379,6                 | 2985,6 ± 531,6                  | 0,293  |
| Porodní délka [cm]       |             | 49,4 ± 1,6                     | 48,4 ± 3,1                      | 0,118  |
| genotyp                  | F508d/F508d | 3 (23,1)                       | 13 (37,1)                       | 0,360†   |
|                          | F508d/other | 10 (76,9)                      | 16 (45,7)                       | 0,054†   |
|                          | other/other | 0 (0)                          | 6 (17,1)                        | 0,111†   |

Ve funkci plic byly mezi věkovými podskupinami nalezeny významné rozdíly. U starších pacientů byl signifikantně vyšší očišťovací index plic z N<sub>2</sub>-MBW ( $\Delta$ LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> = 1,52, 95% CI (0,0; 3,0), p = 0,047), vyšší odpor dýchacích cest ( $\Delta$ R<sub>aw</sub>% = 66,7%, 95% CI (3,4; 129,9), p = 0,040) a vyšší z-skóre FRC<sub>box</sub> ( $\Delta$ FRC<sub>box</sub> z-skóre = 1,68, 95%CI (0,0; 3,3), p = 0,048). Ostatní parametry se mezi skupinami nelišily. Rozdíl funkce plic mezi oběma podskupinami více vyplne při porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých funkčních poruch (viz graf 6.3.2.). Ve skupině CF<sub>velcí</sub> měla signifikantně větší část pacientů zvýšenou nehomogenitu ventilace (LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> > 10) – p = 0,022 a hyperinflaci plic (z-skóre FRC<sub>box</sub> > 2) – p = 0,039. Rozdíly ve výskytu obstrukce periferních dýchacích cest (podle z-skóre parametru V'maxFRC) nebyly vzhledem k malému počtu úspěšných měření v podskupině CF<sub>malí</sub> porovnávány. Bez klinicky významné poruchy funkce plic (tzn. z-skóre -2 < FRC<sub>box</sub> < 2, R<sub>aw</sub> < 145 %, -2 < C<sub>rs</sub> z-skóre < 2, tPTEF/tE z-skóre > -2, LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> < 10,0, V'maxFRC z-

<sup>13</sup> Porovnání charakteristik mezi skupinami CF<sub>malí</sub> a CF<sub>velcí</sub> bylo provedeno pomocí t-testu, pouze p-hodnoty označené † pocházející z testu rozdílu dvou podílů. Tučně zvýrazněné údaje jsou statisticky významné (p-hodnota > 0,05).

skóre  $> -2$ ) bylo 25 % pacientů z podskupiny  $CF_{velcí}$  a 58,3 % z podskupiny  $CF_{malí}$ ,  $p = 0,023$ . Opakovaná měření byla k dispozici u 12 pacientů s CF, průměrný rozestup mezi měřeními byl 30,3 týdne, 95% CI (7,9; 52,7). Za tuto dobu došlo k signifikantnímu poklesu  $LCI2,5_{N2}$  o 2,6 jednotky, 95% CI (1,1; 4,1),  $p = 0,003$ , obdobně tak i parametru  $LCI2,5_{SF6}$  o 2,0 jednotky, 95% CI (1,7; 2,2),  $p < 0,001$  a z-skóre  $LCI2,5_{SF6}$  o 2,1, 95% CI (0,7; 3,4),  $p = 0,022$ . Změny dalších parametrů dosáhly hraniční signifikance: pokles z-skóre RR z 2,7 na 1,8, 95% CI změny (-0,2; 2,1),  $p = 0,088$ , vzestup z-skóre Vt z -2,0 na -0,9, 95% CI změny (-0,7; 2,9),  $p = 0,181$ , vzestup z-skóre  $V'_{maxFRC\%}$  z -1,8 na -1,0, 95% CI (-2,0; 0,4),  $p = 0,130$  atd.



Graf 6.3.2. Zastoupení abnormálních nálezů jednotlivých parametrů funkce plic v celé skupině CF pacientů a jejich podskupinách ( $CF_{malí}$  a  $CF_{velcí}$ ).

#### Ostatní diagnózy

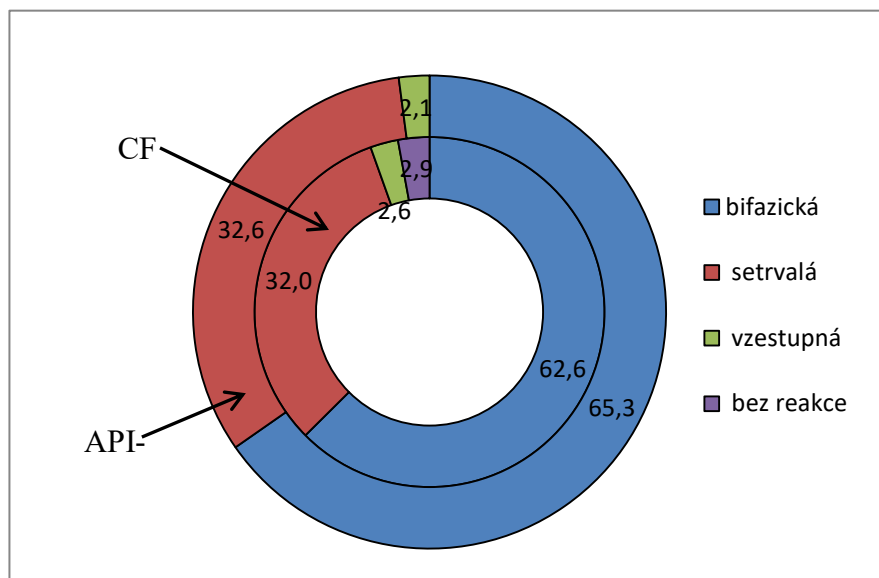
Výsledky funkčního vyšetření u dalších diagnostických skupin pacientů jsou prezentovány pouze popisně, bez podrobnějšího statistického zpracování. Cílem je postihnout typický vzor funkčního postižení u těchto pacientů. Děti s kongenitální brániční hernií měly velmi heterogenní postižení funkce plic. U 55,6 % pacientů byla nalezena obstrukce dýchacích cest se zvýšeným odporem dýchacích cest a sníženým parametrem  $V'_{maxFRC}$ . U 33,3 % pacientů byla zjištěna hyperinflace plicní.  $LCI2,5_{N2}$  nad 10 bylo zjištěno ve 33,3 %. U

jednoho pacienta byl přítomen restriční vzor postižení se z-skóre  $FRC_{\text{box}}$  i  $C_{\text{rs}}$  sníženým pod 2. Ve skupině pacientů s chILD dominovala u tří pacientů se susp. postinfekční obliterující bronchiolitidou a jednou pacientkou s NEHI velmi těžká obstrukční ventilační porucha se sekundární hyperinflací. Tito pacienti měli i výrazně zvýšený odpor dýchacích cest (cca 330 % normy) a  $LCI_{2,5\text{SF}_6}$  (z-skóre 7,5).  $N_2$ -MBW se u dvou z těchto pacientů nepodařilo vzhledem k dlouhému trvání washout fáze vůbec dokončit, u zbylých dvou pak  $LCI_{2,5\text{N}_2}$  dosahovalo extrémních hodnot (18,47 a 23,64 jednotek). Naopak významně snížený byl parametr  $tPTEF/tE$  (z-skóre -5,5) a  $V'_{\text{maxFRC}}$  (z-skóre -2,5), u 2 pacientů bylo dosaženo klidové průtokové limitace. Významně snižená byla i poddajnost dýchacího traktu (z-skóre -3,1). Naopak u pacientky s plicním postižením při histiocytóze z Langerhansových buněk a u pacienta s intersticiálním plicním procesem v důsledku opakovaných aspirací nebyla obstrukční ventilační porucha zjištěna, kombinace funkčních nálezů se spíše blížila restriční ventilační poruše (nižší hodnota  $FRC_{\text{box}}$ , vyšší  $C_{\text{rs}}$ ). Skupina tří pacientů s časně diagnostikovou primární ciliární dyskinezi měla relativně příznivý funkční nález. U žádného z pacientů se nevyskytovala plicní hyperinflace, zvýšený odpor dýchacích cest ani abnormální pružné vlastnosti dýchacího traktu. Pouze u jednoho pacienta byl zaznamenán snížený parametr  $tPTEF/tE$  a  $LCI_{2,5\text{N}_2}$  vyšší než 10.

#### 6.4. Ventilační odpověď na hyperoxii

Ventilační odpověď na hyperoxii bylo z celkového počtu 49 vyšetřených pacientů možno posoudit u 32 dětí s klasickou formou CF (celkem 162 testů) a u 10 pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami a negativním klinickým indexem rizika pro astma (skupina API-) – celkem 70 testů. Všichni analyzovaní pacienti měli nenápadnou perinatální anamnézu a byli bez potřeby oxygenoterapie či ventilační podpory v časném novorozeneckém věku. Hlavním důvodem pro vyčlenění měření z analýzy byl nepravidelný dechový vzor během  $N_2$ -MBW. Méně často jsem zaregistroval technické problémy s měřením koncentrace plynů ve vydechaném vzduchu.

Klasická bifázická odpověď byla detekována u 62,6 % pacientů s CF a 65,3 % pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami. Zastoupení dalších typů ventilačních odpovědí je znázorněno v grafu 6.3.3. Skupiny CF a API- se nelišily zastoupením jednotlivých typů ventilačních odpovědí (všechny p hodnoty > 0,05).



Graf 6.3.3. Zastoupení jednotlivých typů ventilační odpovědi na hyperoxii u pacientů s CF a opakovanými obstrukčními epizodami.

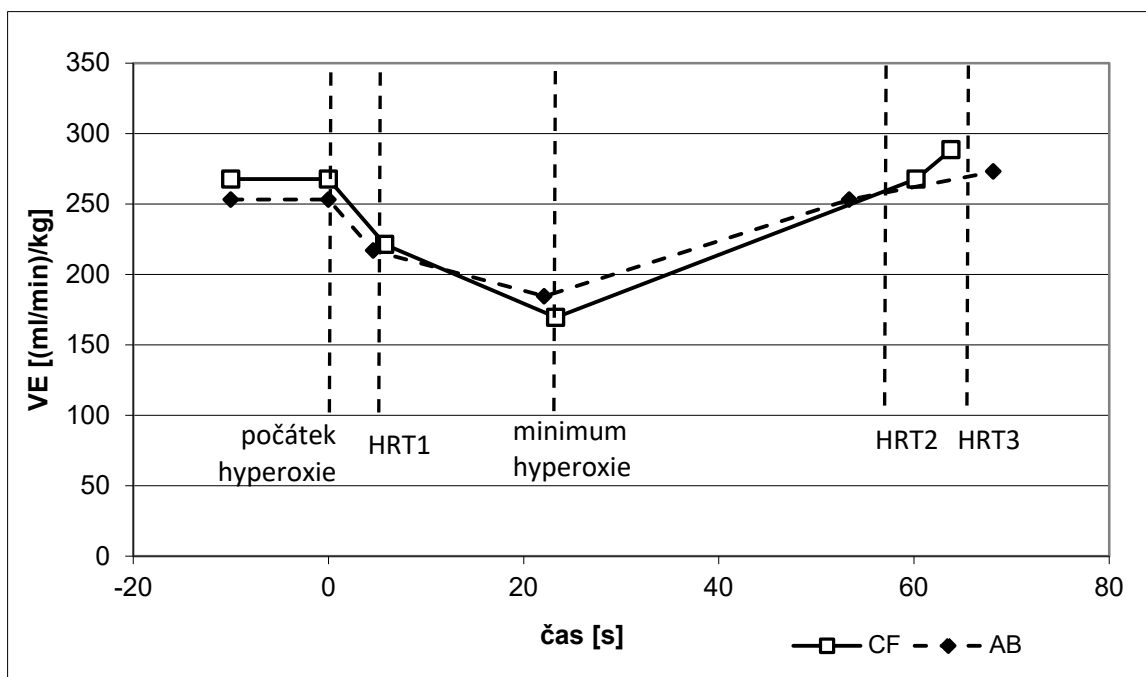
Ventilační odpověď pacientů s CF na hyperoxii nastala v průměru za  $5,8 \pm 1,5$  s (HRT1), následný vzestup ventilace do normoxických hodnot se objevil za  $60,2 \pm 22,1$  s od počátku hyperoxie (HRT2). U 20 pacientů (44 měření) byl registrován i vzestup VE nad 95. percentil normoxických hodnot – HRT3 =  $63,8 \pm 19,2$  s. Pokles minutové ventilace počítaný za dobu mezi HRT1 a HRT2 (VEDrop-pokles%) byl u CF pacientů v průměru  $17,7 \pm 5,2$  % (z  $267,6$  (ml/min)/kg na  $221,2$  (ml/min)/kg), v případě hodnocení poklesu k minimálním hodnotám za hyperoxie (VEDrop-min%) se jednalo o  $37,0 \pm 15,2$  % ( $VE_{\min} = 169,5$  (ml/min)/kg). Časový průběh ventilační odpovědi na hyperoxii je schematicky znázorněn na grafu 6.3.4. Zmíněný pokles minutové ventilace byl dán jak významným poklesem dechového objemu, tak poklesem dechové frekvence. Dechový objem ( $V_t$ ) poklesl z  $8,38 \pm 1,52$  ml/kg na  $6,97 \pm 1,32$  ml/kg jakožto průměrná hodnota mezi časy HRT1 a 2, resp. na  $5,04 \pm 1,71$  ml/kg jakožto minimální hodnota za hyperoxie, oba dva poklesy jsou statisticky signifikantní – obě  $p < 0,001$ . Dechová frekvence poklesla z  $33,0 \pm 6,5$  /min během normoxie na  $30,0 \pm 5,9$  /min v období HRT1-HRT2 ( $p < 0,001$ ), resp. na  $26,8 \pm 4,9$  /min jakožto minimum za hyperoxie ( $p < 0,001$ ). Časování jednotlivých dechových fází (parametr  $t_I/t_E$ ) se vlivem hyperoxie neměnilo (změna z  $0,79 \pm 0,15$  na  $0,77 \pm 0,16$ ,  $p = 0,533$ ), obdobně tak se neměnil časový průběh expirace (parametr  $t_{PTEF}/t_E$  poklesl z  $0,33 \pm 0,10$  na  $0,32 \pm 0,11$ ,  $p = 0,213$ ). Kvantitativní charakteristiky ventilační odpovědi na hyperoxii u pacientů s CF a nenápadnou perinatální anamnézou nezávisely na věku pacienta, gestačním stáří ani porodní hmotnosti – viz tabulka 6.3.4.

Tab. 6.3.4. Vztah kvantitativních parametrů ventilační odpovědi na hyperoxii k vybraným charakteristikám pacientů ze skupiny CF a API-.<sup>14</sup>

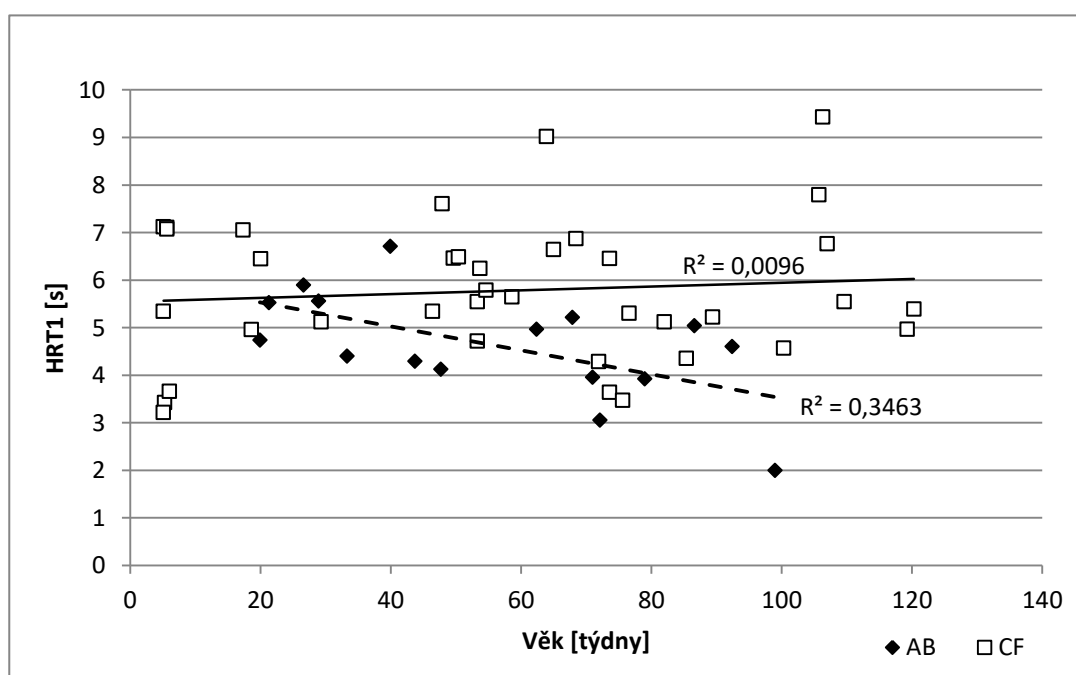
|                | CF                      |                         |                        | API-                                  |                                       |                                       |
|----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                | Věk                     | Gestační stáří          | Porodní hmotnost       | Věk                                   | Gestační stáří                        | Porodní hmotnost                      |
| HRT1           | r = -0,019<br>p = 0,910 | r = -0,048<br>p = 0,775 | r = 0,017<br>p = 0,922 | <b>r = -0,588</b><br><b>p = 0,017</b> | r = -0,329<br>p = 0,214               | r = 0,168<br>p = 0,535                |
| VEDrop pokles% | r = -0,316<br>p = 0,406 | r = 0,052<br>p = 0,759  | r = 0,249<br>p = 0,073 | r = 0,179<br>p = 0,506                | <b>r = -0,497</b><br><b>p = 0,040</b> | <b>r = -0,522</b><br><b>p = 0,038</b> |

U pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami nastala ventilační odpověď na hyperoxii v průměru za 4,6±1,1 s (HRT1), následný vzestup ventilace do normoxických hodnot se objevil za 53,4±11,4 s od počátku hyperoxie (HRT2). U 10 pacientů (25 měření) byl registrován i vzestup VE nad 95. percentil normoxických hodnot – HRT3 = 68,2±9,8 s. Pokles minutové ventilace počítaný za dobu mezi HRT1 a HRT2 (VEDrop-pokles%) byl v průměru 13,8±3,52 % (z 253,06 (ml/min)/kg na 216,8 (ml/min)/kg), v případě hodnocení poklesu k minimálním hodnotám za hyperoxie (VEDrop-min%) se jednalo o 25,0±7,9 % (VEmin = 184,5 (ml/min)/kg). Časový průběh ventilační odpovědi na hyperoxii je schematicky znázorněn na grafu 6.3.4. Obdobně jako u CF pacientů byl ve skupině API- pokles minutové ventilace dán jak významným poklesem dechového objemu tak i dechové frekvence. Dechový objem poklesl z 8,49±1,12 ml/kg na 7,48±0,94 ml/kg jakožto průměrná hodnota mezi časy HRT1 a 2, resp. na 6,38±0,96 ml/kg jakožto minimální hodnota za hyperoxie, oba dva poklesy jsou statisticky signifikantní – obě p < 0,001, RR se změnila z 30,5±7,1 /min během normoxie na 28,2±6,1 /min v období HRT1 až HRT2 (p < 0,001), resp. na 25,4±5,5 /min jakožto minimum za hyperoxie (p < 0,001). Časování jednotlivých dechových fází (parametr tI/tE) se vlivem hyperoxie u pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami velmi mírně, ale statisticky signifikantně změnilo (tI/tE z 0,70±0,09 na 0,67±0,09; p = 0,013). Naopak časový průběh expirace (parametr tPTEF/tE) se nezměnil. Čas odpovědi na hyperoxii (HRT1) ve skupině API- závisel nepřímo úměrně na věku pacienta – s rostoucím věkem pacienta signifikantně klesal (graf 6.3.5.). Naopak míra poklesu ventilace za hyperoxie závisela nepřímo úměrně na gestačním stáří a porodní hmotnosti (tabulka 6.3.4.).

<sup>14</sup> HRT1 – 1. čas ventilační odpovědi na hyperoxii, VEDrop pokles% – pokles minutové ventilace mezi časy HRT1 a HRT2 v procentech původních hodnot.



Graf 6.3.4. Schematické znázornění průběhu ventilační odpovědi na hyperoxii.



Graf 6.3.5. Závislost času odpovědi na hyperoxii (HRT1) na věku pacienta ve skupině CF a API-.



Charakteristiky ventilační odpovědi na hyperoxii se lišily mezi pacienty s CF a opakovanými obstrukčními epizodami. I přes shodné základní antropometrické a perinatální charakteristiky (věk, hmotnost, délka, gestační stáří, porodní hmotnost) byl mezi skupinami rozdíl v rychlosti a hloubce odpovědi na hyperoxii. U dětí s CF byl HRT1 významně delší než ve skupině API- ( $\Delta\text{HRT1} = 1,1 \text{ s}$ ,  $p = 0,008$ ), pokles minutové ventilace byl ve skupině CF též hlubší ( $\Delta\text{VEDrop pokles\%} = 3,9 \%$ ,  $p = 0,009$ ,  $\Delta\text{VEDrop min\%} = 12,1 \%$ ,  $p = 0,004$ ). Parametry HRT2, HRT3, Vt a RR včetně jejich změn se mezi skupinami nelišily.

Variabilita parametrů charakterizujících ventilační odpověď na hyperoxii byla poměrně vysoká. I po manuálním očištění dat od odlehlých měření (viz kapitola 5.2.4. Analýza ventilační odpovědi na hyperoxii) byl průměrný koeficient variability (CV) jednotlivých parametrů kolem 15 % (viz tabulka 6.3.5.).

Tab. 6.3.5. Variabilita a opakovatelnost parametrů charakterizujících ventilační odpověď na hyperoxii u pacientů s CF a opakovanými obstrukčními epizodami.<sup>15</sup>

|                 | CF     |      | API-   |      |
|-----------------|--------|------|--------|------|
|                 | CV [%] | CR   | CV [%] | CR   |
| HRT1            | 16,4   | 4,0  | 9,7    | 3,1  |
| HRT2            | 16,3   | 73,4 | 18,5   | 35,7 |
| HRT3            | 16,2   | 56,1 | 14,2   | 26,8 |
| VEDrop pokles % | 16,8   | 14,3 | 13,5   | 9,5  |
| VEDrop min %    | 18,5   | 41,5 | 14,2   | 21,3 |

V souvislosti se změnou ventilace během hyperoxie došlo i ke změnám koncentrace  $\text{CO}_2$  na konci výdechu ( $\text{etCO}_2$ ) – byl pozorován mírný, ale signifikantní vzestup  $\text{etCO}_2$  z  $5,55 \pm 0,45 \%$  na  $5,64 \pm 0,44 \%$  ( $p < 0,001$ ). Obdobně tak u pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami došlo k vzestupu  $\text{etCO}_2$  (z  $5,59 \pm 0,50 \%$  na  $5,67 \pm 0,53 \%$ ,  $p < 0,001$ ).

<sup>15</sup> CF – cystická fibróza, AB – opakované obstrukční epizody, CV – koeficient variability, CR – koeficient opakovatelnosti, HRT1/2/3 – 1./2./3. čas ventilační odpovědi na hyperoxii, VEDrop pokles% – pokles průměrné minutové ventilace mezi časy HRT1 a HRT2 vyjádřený v procentech normoxických hodnot, VEDrop min% – pokles minimálních hodnot minutové ventilace v období mezi HRT1 a HRT2 vyjádřený v procentech normoxických hodnot.

## 6.5. Morfologické změny sliznice dýchacích cest

Bronchoskopie spolu s endobronchiální biopsií byla provedena u celkem 19 pacientů s chronickým respiračním onemocněním (10x CF, 3x PCD a 6x AB). Hodnotitelný vzorek sliznice byl k dispozici u 11 z nich (6x CF, 1x PCD, 4x AB), úspěšnost endobronchiální biopsie kleštěmi o průměru 1,2 mm byla v průměru 57,9 %. V souvislosti s odběrem nebyly krom krátkého povrchního krvácení zaznamenány žádné další komplikace (laryngospasmus, bronchospasmus, desaturace s nutností intubace, pneumotorax, atd.). Kontrolní vzorky endobronchiální biopsie byly k dispozici od 3 pacientů s patologií horních cest dýchacích a 2 dětí po aspiraci cizího tělesa.

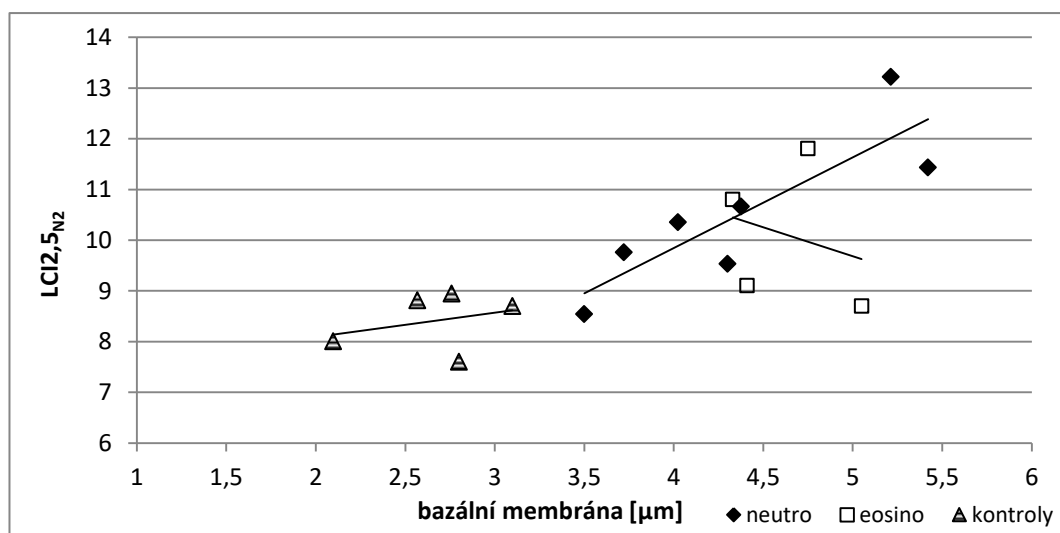
Rozsah odebraných vzorků umožňoval u všech pacientů spolehlivé hodnocení bazální membrány. Reprezentativní vzorek lamina propria mucosae byl k dispozici též u všech pacientů. Hodnocení změn povrchového epitelu bylo možno provést jen u 5 pacientů, hlavní limitací byly artefakty v souvislosti s odběrem vzorku (pohmoždění či jeho stržení). Svalovina byla zachycena jen u tří pacientů.

V porovnání s kontrolní skupinou byla bazální membrána pacientů s chronickým respiračním onemocněním zřetelně silnější (tabulka 6.5.1.). Signifikantně širší byla bazální membrána jak u pacientů s neutrofilním zánětem (CF+PCD),  $p < 0,001$ , tak s eosinofilním zánětem (AB),  $p < 0,001$ . Rozdíly v zastoupení lamininu nebyly tak jednoznačné, nicméně trend k zesílení této vrstvy u pacientů s chronickým onemocněním bylo možno též vysledovat ( $p = 0,081$  pro neutrofilní zánět,  $p = 0,066$  pro eosinofilní zánět). Naopak v případě kolagenu IV jsme pozorovali nesignifikantně širší vrstvu u kontrol. Počet buněk v lamina propria mucosae vztažený na jednotku plochy u pacientů s chronickým respiračním onemocněním převyšoval hodnoty u kontrol a těsně nedosáhl statistické významnosti ( $p = 0,068$  u neutrofilního zánětu,  $p = 0,057$  u eosinofilního zánětu). Ačkoliv přímý průkaz jednotlivých typů zánětlivých elementů nebyl proveden, lze konstatovat, že při stonásobném zvětšení (imerzní technika) dominovaly u pacientů s CF polymorfonukleáry, u dvou pacientů s AB pak mononukleáry, u dalších dvou byl nálezní nejednoznačný. U 2 pacientů s cystickou fibrózou bylo možno konstatovat známky počínající dlaždicové metaplázie s vyšším zastoupením drobnějších buněk v povrchovém epitelu a náhradou cylindrických buněk s řasinkami buňkami nižšími a bez zřetelného ciliárního lemu. U zbylých 3 pacientů byl nálezní necharakteristický. Míra nehomogenity ventilace ( $LCI_{2,5N_2}$ ) se sice nelišila mezi pacienty s neutrofilním a eosinofilním zánětem navzájem, ale byla významně zvýšená oproti kontrolám ( $p = 0,016$  v případě neutrofilního zánětu,  $p = 0,047$  v případě eosinofilního zánětu).

Tab. 6.5.1. Vybrané morfologické a funkční charakteristiky podskupiny pacientů s chronickým respiračním onemocněním a kontrol.<sup>16</sup>

|   | CF (n = 6)       | PCD (n = 1) | AB (n = 4)      | Kontroly (n = 5) |
|---|------------------|-------------|-----------------|------------------|
| Bazální membrána [ $\mu\text{m}$ ]                  | $4,38 \pm 0,79$  | 4,30        | $4,69 \pm 0,36$ | $2,70 \pm 0,55$  |
| Laminin [ $\mu\text{m}$ ]                           | $2,00 \pm 0,31$  | 1,63        | $1,88 \pm 0,06$ | $1,57 \pm 0,14$  |
| Kolagen IV [ $\mu\text{m}$ ]                        | $1,63 \pm 0,30$  | 1,61        | $1,73 \pm 0,04$ | $1,99 \pm 0,20$  |
| Celulizace lamina propria [počet/ $\mu\text{m}^2$ ] | $35,7 \pm 8,2$   | 55,8        | $37,5 \pm 9,8$  | $18,6 \pm 11,9$  |
| BALF neutro [%]                                     | $44,9 \pm 11,4$  | 40,8        | $15,5 \pm 13,5$ | $9,9 \pm 2,9$    |
| BALF lymfo [%]                                      | $17,2 \pm 13,9$  | 1,2         | $78,0 \pm 12,0$ | $13,5 \pm 5,2$   |
| FRC <sub>N2</sub> [%]                               | $141,6 \pm 23,4$ | 131,9       | $123,3 \pm 3,3$ | $123,7 \pm 9,6$  |
| LCI2,5N <sub>2</sub>                                | $10,7 \pm 1,6$   | 9,5         | $9,8 \pm 1,1$   | $8,6 \pm 0,4$    |

V dalším kroku byl u pacientů s oběma typy chronického zánětu dýchacích cest hodnocen vztah remodelace bazální membrány k funkčnímu postižení. U 7 pacientů s CF a PCD byla nalezena těsná a jednoznačně rostoucí závislost mezi šířkou bazální membrány a LCI2,5N<sub>2</sub> ( $r = 0,856$ ;  $p = 0,014$ ; rovnice přímky:  $y = 1,788x + 2,691$ ; graf 6.5.1.). Korelace ve skupině s eosinofilním zánětem (AB) tak těsná nebyla a závislost byla spíše klesající ( $r = 0,259$ ;  $p = 0,600$ ; rovnice přímky:  $y = -1,136x + 15,367$ ), v kontrolní skupině byla závislost mírně rostoucí a podstatně méně těsná než ve skupině CF+PCD ( $r = 0,303$ ;  $p = 0,873$ ; rovnice přímky:  $y = 0,477x + 7,141$ ; graf 6.5.1.).



Graf 6.5.1. Vztah remodelace dýchacích cest (šířka bazální membrány) a poruchy funkce plic (nehomogenita ventilace, LCI2,5N<sub>2</sub>).

<sup>16</sup> CF – cystická fibróza, PCD – primární ciliární dyskineze, AB – opakované obstrukční epizody, BALF – tekutina z bronchoalveolární laváže, FRC<sub>N2</sub> – funkční reziduální kapacita z N<sub>2</sub>-MBW, LCI2,5N<sub>2</sub> – očišťovací index plic na úrovni 2,5 % původní koncentrace dusíku.

## 7. Diskuze

Předkládaná dizertační práce se zabývá technickými aspekty a klinickým využitím metod plicní funkční diagnostiky nespolupracujících dětí a morfologického vyšetření vzorků endobronchiálních biopsií pro účely detekce časných patofyziologických změn dýchání kojenců a batolat s chronickým plicním onemocněním, resp. v riziku jeho rozvoje. Kromě jejich využití v běžné klinické praxi je pozornost věnována i jejich výzkumnému potenciálu zejména s ohledem na vztah morfologie a funkce dýchacího traktu. Vzhledem k diskrétnímu rozsahu patofyziologických změn časných stádií chronických respiračních onemocnění je práce zaměřena právě na tyto sofistikované metody, které mají jako jediný potenciál zachytit první – většinou klinicky němá – stádia.

U 95 pacientů s cystickou fibrózou, opakovanými obstrukčními epizodami, vrozenou brániční kýlou, intersticiálním plicním onemocněním a primární ciliární dyskinezi byla demonstrována bezpečnost a vysoká proveditelnost funkčního vyšetření. Dále bylo zjištěno, že technické aspekty vyšetření a způsob měření daného parametru významným způsobem ovlivňují jeho absolutní hodnotu. Ačkoliv mezi parametry  $LCI_{2,5N_2} \leftrightarrow LCI_{2,5SF_6}$ ,  $R_{aw} \leftrightarrow R_{rs}$  a  $FRC_{box} \leftrightarrow FRC_{gas}$  byla nalezena signifikantní korelace, nejsou jejich absolutní hodnoty zaměnitelné. Předpokládáme, že tyto rozdíly jsou dány jednak technickými aspekty měření, jednak i fyziologickými mechanismy souvisejícími s vlastním měřením (viz dále). Naopak mezi parametry hodnotícími odlišné aspekty funkce plic (např. průchodnost průdušek na různých úrovních bronchiálního větvení) korelace nalezena nebyla (např. nenašel jsem signifikantní vztah mezi  $R_{aw} \leftrightarrow LCI_{2,5}$ ,  $V'_{maxFRC} \leftrightarrow LCI_{2,5}$  a  $V'_{maxFRC} \leftrightarrow R_{aw}$ ). Toto dokládá smysluplnost vzájemné kombinace více metod iPFT v běžné klinické praxi. V přesně definovaných skupinách pacientů byl též demonstrován klinický potenciál vybraných parametrů funkce plic. Např. hodnoty parametru  $LCI_{2,5N_2}$  vyšší než 10 měly u pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami vysokou specifitu i sensitivitu (~75 %) pro pozitivní Asthma Predictive Index. Lze tedy předpokládat, že by tento parametr mohl být využíván při hodnocení rizika pacientů pro pozdější rozvoj bronchiálního astmatu. Dále byly nalezeny významné kvalitativní a kvantitativní rozdíly ve ventilační odpovědi na hyperoxii mezi pacienty s CF a opakovanými obstrukčními epizodami. To dokládá odlišné funkční nastavení jejich periferních chemoreceptorů.

Na vzorku 11 pacientů s CF, PCD a opakovanými obstrukčními epizodami byla potvrzena bezpečnost endobronchiálních biopsií i v kategorii nejmenších dětí (< 2 roky života). Limitací této metody zůstává její nízká výtěžnost (~50 %) a pouze omezená možnost

hodnotit více aspektů remodelace dýchacích cest (na získaných vzorcích byla hodnotitelná zejména bazální membrána). Ačkoliv design studie neumožňoval posoudit přímý klinický dopad morfologického vyšetření vzorků bronchiální sliznice, relativně těsná korelace mezi poruchou funkce plic (nehomogenita ventilace) a šířkou bazální membrány u pacientů s chronickým neutrofilním zánětem (CF a PCD) naznačuje význam morfologického vyšetření i pro klinickou praxi.

### **7.1. Bezpečnost a proveditelnost vyšetření**

Během 126 funkčních měření u 95 pacientů došlo při respektování absolutních a relativních kontraindikací pouze ke 4 epizodám vyžadujícím přerušení měření. Jednalo se o desaturace, které velmi dobře reagovaly na napolohování dítěte. Velmi pravděpodobně se tedy jednalo o desaturace na podkladě přechodné obstrukce horních cest dýchacích nikoliv hypoventilace, tak jak to bylo popsáno autory Mallol a Sly u dětí s doznívající obstrukční bronchitidou [Mallol J., Sly PD., 1988]. Významné hypoventilace ( $VE < 150 \text{ (ml/min)/kg}$ ) nebyly ve studovaném souboru vůbec zaregistrovány. Z tohoto důvodu považujeme metody iPFT za bezpečné a v současnosti zavedené absolutní a relativní kontraindikace vycházející z doporučení Americké asociace pro respirační péči (AARC) [AARC Clinical Practice Guideline, 1995, update 2008] používané i v naší laboratoři za plně vyhovující.

Vyšetření iPFT se ukázalo jako značně technicky náročné. Pro zajištění akceptovatelné kvality měření je zapotřebí dostatečná erudice a praktická zkušenost personálu. Již během samotného měření je třeba rozpoznat jeho technické nedostatky, tak aby bylo možné případné chyby (nevhodná poloha masky, netěsnosti atd.) upravit a během krátké doby spánku dítěte získat dostatečné množství validních dat pro následnou interpretaci. Z hlediska času je na vyšetření jednoho pacienta nutno rezervovat cca 2 – 3 hodiny – pro kalibraci přístroje, sedaci pacienta, vlastní měření, interpretaci výsledků, observaci pacienta po sedaci a desinfekci přístroje. Finanční náročnost jednoho vyšetření iPFT je Evropskou Společností pro Cystickou Fibrózu (ECFS) odhadována na cca 2000 € (započítána jen jedna metoda RTC) [Matecki S. et al, 2016]. Současná úhrada v ČR je však pouze cca 1100 Kč za kompletní vyšetření. Ve shodě se zahraničními publikacemi [Peterson-Carmichael SL. et al., 2014], [Davis SD. et al., 2010], [Gappa M. et al., 2001], tedy konstatujeme, že iPFT je velmi náročný diagnostický nástroj, který není určen k rutinnímu použití.

V souvislosti se značnou technickou náročností iPFT nepřekvapuje úspěšnost našich měření pohybující se v průměru mezi 70 – 80 %. Tyto hodnoty jsou sice mírně nižší než

v případě výzkumných aktivit, ale považujeme je za plně srovnatelné se zahraničními pracovišti. V multicentrické studii zahrnující data z 10 evropských a severoamerických center byla hodnocena úspěšnost iPFT u kojenců s cystickou fibrózou [Davis SD. et al., 2010]. V případě bodyplety-smografického měření FRC bylo dosaženo 89% úspěšnosti, v případě metody torakoabdominální komprese pak úspěšnost byla 72 %. Katier et al [Katier N. et al., 2005] udávají úspěšnost měření pasivní mechaniky dýchacího traktu jednookluzní metodou 73 %. V případě testu SF<sub>6</sub>-MBW dosáhli Stafler et al [Stafler P. et al., 2017] úspěšnosti 52 % v případě dětí s akutní „bronchiolitidou“ (obstrukční bronchitidou), v případě zdravých kontrol pak 83 %. K měření byl použit přístroj Exhalyzer D firmy Ecomedics, vyšetření proběhlo v přirozeném spánku, věkové rozmezí pacientů se pohybovalo mezi 1 – 12 měsíci. Je třeba podotknout, že vyšetření v případě studijní skupiny bylo provedeno v akutní fázi onemocnění a 93,1 % pacientů vyžadovalo v době přijetí oxygenoterapii. Toto jistě významným způsobem snížilo úspěšnost měření. Stahl et al. [Stahl M. et al., 2014] studovali proveditelnost SF<sub>6</sub>-MBW na vzorku 14 kojenců a batolat s CF. Výsledná úspěšnost měření byla 67,5 % (přístroj Exhalyzer D, vyšetření provedené v sedaci, věkové rozmezí pacientů 0,2 – 3,2 let, průměr 1,3±1,0 let). V případě multicentrické studie pak dosáhli Stahl et al. [Stahl M. et al., 2017] úspěšnosti 91,8 %. Jednalo se však o děti starší (průměrný věk 2,3±1,2 let) a zahrnuti byli i pacienti s jiným plicním postižením (např. primární ciliární dyskineze, obliterující bronchiolitida, chronické renální selhání V. stupně) a zdravé kontroly. Informace o proveditelnosti metody N<sub>2</sub>-MBW u kojenců jsou zatím velmi limitované. V současné době jsou mi známa pouze tři další pracoviště (Pediatrická klinika Universitní nemocnice Bern, Švýcarsko; Dětská nemocnice královny Silvie, Götterborg, Švédsko a Oddělení respirační medicíny, Dětská nemocnice ve Westmeadu, Sydney, Austrálie), která se touto metodou u nespolupracujících dětí zabývají. Naše data o proveditelnosti N<sub>2</sub>-MBW u kojenců, která jsme i publikovali [Koucký V. et al., 2018] patří mezi prvotní informace v této oblasti.

Bezpečnost endobronchiálních biopsií je velmi dobře zmapovaná především u starších dětí [Bush A., Pohunek P., 2000], [Salva PS. et al., 2003], [De Blic J. et al., 2002], [Sagani S. et al., 2003], [Molina-Teran A. et al., 2006]. Ve shodě s našimi výsledky udávají zmíněné práce krátké a povrchové krvácení jako nejčastější komplikaci endobronchiálního odběru. S ostatními komplikacemi (např. bronchospasmus, laryngospasmus, desaturace s nutností intubace, pneumotorax, atd.) jsme se v našem malém vzorku nesetkali. Výťažnost endobronchiálních biopsií prováděná menšími klišťkami (1,2 mm) je obecně udávána jako nižší než v případě většího instrumentária (2,0 mm) [Regamey N. et al., 2007]. V této práci autoři udávají úspěšnost 57 % u dětí pod 4 roky života, což je srovnatelné s našimi daty.

## 7.2. Vzájemný vztah mezi vybranými parametry funkce plic

Vyšetřovací protokol iPFT umožňuje měřit řadu funkčních parametrů různými metodami. Ačkoliv z obecného pohledu lze předpokládat shodu mezi takto získanými výsledky, naše data ukazují opak. To bylo potvrzeno pro funkční reziduální kapacitu, očišťovací index plic i odpor dýchacích cest resp. dýchacího traktu. Tyto rozdíly lze přisuzovat jednak technickým aspektům měření, jednak i fyziologickým zákonitostem.

V případě porovnání funkční reziduální kapacity stanovené diluční a bodyplety-smografickou metodou hrají zcela zásadní roli technické aspekty vyšetření. Bodyplety-smografická metoda vychází z Boyleova-Mariottova zákona pro ideální plyn, který říká, že za izotermických podmínek je součin tlaku a objemu konstantní. V důsledku toho jsou při okluzi dýchacích cest změny tlaku v bodyplety-smografu úměrné změnám objemu plynu v hrudníku, který je dýchacími pohyby stlačován, resp. rozpínán. Naopak v rámci dilučních metod (typicky v uzavřeném systému) je FRC stanovena pomocí modifikovaného Fickova principu (vychází ze zákona zachování hmoty) – vzorek vyšetřovacího plynu o známém objemu a známé koncentraci je rozředěn v neznámém objemu vzduchu s koncentrací vyšetřovacího plynu rovnou nule. Ze známého objemu vyšetřovacího plynu a z jeho počáteční a výsledné koncentrace je pak možno vypočítat neznámý objem, ve kterém byl vzorek plynu rozředěn. V případě metod N<sub>2</sub>-MBW a SF<sub>6</sub>-MBW se sice jedná o otevřený vícedechový systém, nicméně princip „ředění“ je zde zachován.

Skutečnost, že se bodyplety-smograficky měří veškerý stlačitelný vzduch v hrudníku a dilučními metodami jen ten komunikující s dýchacími cestami, je zcela zásadní pro interpretaci rozdílu mezi FRC<sub>box</sub> a FRC<sub>gas</sub>. Na základě těchto principiálních rozdílů lze usuzovat, že u zdravých jedinců bude za optimálních podmínek platit:

$$FRC_{box} > FRC_{gas}.$$

Tento malý rozdíl bude odpovídat stlačitelnému vzduchu v hrudníku, který nekomunikuje s dýchacími cestami. Zmíněný vztah pak bude zvýrazněn u pacientů s obstrukcí dýchacích cest a fenoménem air-trappingu, kde rozdíl obou hodnot FRC bude navýšen o objem vzduchu „za obstrukcí“.

Realita však takto jednoznačná není. Data přímo porovnávající bodyplety-smografické a diluční metody jsou poněkud rozporuplná. Hodnoty FRC<sub>box</sub> převyšující FRC<sub>gas</sub> byly prokázány např. u dětí ve věku 6 – 17 let v práci prof. Zapletala [Zapletal A. et al., 1984]. Zde byla i definována míra „fyziologického rozdílu“ – cca 20 %. Obdobně tak Cogswell a spoluautoři [Cogswell JJ. et al., 1975] prokázali, že u dětí ve věku 5 – 15 let (výška 110 – 180 cm) je FRC<sub>box</sub> v průměru o 206 ml vyšší než FRC<sub>gas</sub>. Naopak Kraemer [Kraemer R. et al.,

1986] nenašel u dětí ve věku 7 – 17 let signifikantní rozdíl mezi  $FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{\text{gas}}$ . I některé další práce u dospělých jedinců také nenalezly významný rozdíl obou hodnot [DuBois AB. et al., 1956], [Tierney DF., Nadel JA., 1962].

Situace v případě měření FRC u kojenců je obdobná. Význam technických aspektů vyšetření lze demonstrovat na vývoji referenčních hodnot  $FRC_{\text{box}}$  publikovaných od 2. poloviny 20. století, kdy byl pozorován jejich setrvalý pokles. Jako vysvětlení byl zvažován sekulární trend, nicméně aktuálně jsou za hlavní příčinu považovány právě technické aspekty samotného měření (mrtvý prostor přístroje, přesnost senzorů atd.) [Hülkamp G. et al, 2003]. U starších prací je třeba počítat i s tím, že měření byla prováděna na přístrojích vlastní výroby, v řadě případů bez dostatečné validace, rozdíly byly i v protokolu samotného měření.

Naše data porovnávají bodyplety-smografickou metodu měření FRC a 2 diluční metody ( $N_2$ -MBW a  $SF_6$ -MBW). V případě  $FRC_{SF_6}$  a  $FRC_{\text{box}}$  byly výsledky z bodyplety-smografie o cca 18 % vyšší. Jelikož studie přímo porovnávající  $FRC_{SF_6}$  a  $FRC_{\text{box}}$  u kojenců nám není zatím známa, srovnáme naše výsledky se studiemi využívající heliový washout. Toto porovnání má určité limitace – v první řadě odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti použitých plynů ( $SF_6$  má vysokou molekulovou hmotnost, He naopak nízkou a difunduje podstatně rychleji). Dále je třeba brát v potaz způsob měření koncentrace daného plynu, která může též významným způsobem ovlivnit výsledky testu. Yuksel et al. [Yuksel B., Greenough A., 1995] prokázal u 24 zdravých novorozenců vyšší hodnotu  $FRC_{\text{box}}$  než  $FRC_{\text{He}}$  (29,8 vs. 27,1 ml/kg,  $p < 0,01$ , relativní rozdíl 9,1 %). Měření koncentrace plynu bylo provedeno na hmotnostním spektrometru. Thomas et al. [Thomas MR. et al., 2004] ve skupině předčasně narozených dětí porovnávali plicní funkce u pacientů léčených konvenční ventilací (KV) a vysokofrekvenční oscilační ventilací (HFOV). Použity byly mimo jiné bodyplety-smografie a heliový washout (opět hmotnostní spektrometr). V obou skupinách byly hodnoty  $FRC_{\text{box}}$  vyšší než  $FRC_{\text{He}}$  (ve skupině KV o 2,8 ml/kg tzn. 10,4 %, ve skupině HFOV o 3 ml/kg tzn. 11,3 %, statistické porovnání není k dispozici). Naše data jsou ve shodě s těmito dřívějšími nálezy, nicméně rozdíl mezi  $FRC_{SF_6}$  a  $FRC_{\text{box}}$  je zřetelně vyšší (17,8 % proti cca 11 %). To může být vysvětleno jednak technickými rozdíly mezi helium diluční metodou a  $SF_6$ -MBW (typ plynu, způsob měření), jednak pak i možným vyšším výskytem fenoménu air-trapingu u našich pacientů. Jednoznačnou limitací naší práce je absence zdravých kontrol, které by umožnily alespoň částečně posoudit rozsah air-trapingu u našich pacientů.

Při porovnání  $FRC_{\text{box}}$  a druhé diluční metody –  $N_2$ -MBW jsme mezi oběma metodami nenašli v našem souboru signifikantní rozdíl. Toto je v rozporu jak s daty z  $SF_6$ -MBW, tak s pracemi publikovanými před rokem 2001. Gappa et al. [Gappa M. et al., 1993] u 11



zdravých kojenců a batolat (rozmezí věku 2 – 18 měsíců) ukázala, že hodnoty  $FRC_{box}$  převyšují  $FRC_{N_2}$  o 3,9 ml/kg, tzn. 15,2 %,  $p = 0,001$ . Eber et al. [Eber E. et al., 1994] porovnávali u kojenců s opakovanými obstrukčními epizodami hodnotu  $FRC_{N_2}$  stanovenou dusíkovým washoutem s hodnotami  $FRC_{box}$  stanovenými při end-inspiračním i end-expiračním uzávěru. Měření bylo provedeno na přístrojích vlastní výroby (v případě dusíkové diluční metody byl použit hmotnostní spektrometr).  $FRC$  z dusíkového washoutu vyšla o 5,1 ml/kg tzn. 16,9 % nižší než  $FRC_{box}$  při end-inspirační uzávěru,  $p < 0,05$ , korekce na  $V_{occ}$  (objem při okluzi) byla provedena. Naopak  $FRC_{N_2}$  se signifikantně nelišila od  $FRC_{box}$  při end-expiračním uzávěru. Obdobně Wauer et al. [Wauer RR. et al., 1998] porovnali hodnoty  $FRC_{box}$  měřené komerčně dodávaným přístrojem Jaeger a hodnoty  $FRC_{gas}$  stanovené dusíkovým washoutem (přístroj SensorMedics 2600, USA, hmotnostní spektrometr) u novorozenců s a bez bronchopulmonální dysplazie. U obou skupin byla hodnota  $FRC_{box}$  signifikantně vyšší než  $FRC_{gas}$ . Naopak v novější práci Castile et al. [Castile RG. et al., 2004] hodnotili rozdíl v množství zadržného vzduchu u kojenců s CF a zdravých kontrol. Provedli měření  $FRC$  bodyplety-smograficky a dusíkovým washoutem. Hodnoty  $FRC_{N_2}$  převyšovaly  $FRC_{box}$  o 6 ml (6,3 %) u zdravých kojenců, resp. o 1 ml (0,9 %) u pacientů s CF (statistické porovnání s ohledem na cíle studie nebylo provedeno). K měření nebyl použit hmotnostní spektrometr, ale dusíkový analyzátor (Model H, výrobce P. K. Morgan, Andover, MA), bodyplety-smografické měření bylo provedeno na přístroji vlastní výroby. V případě našeho měření  $FRC_{N_2}$  je použita nepřímá metoda stanovení koncentrace  $N_2$  ve vydechovaném vzduchu (viz sekce Metodika). Tato metoda byla validována in vitro [Singer F. et al., 2012]. Pro kojenecký model plic s přednastavenou  $FRC$  v rozmezí 100 – 400 ml byla chyba měření  $FRC$  pod 7 %. In vivo však u kojenců tato metoda validována zatím nebyla. Validací data jsou k dispozici pouze u dospělých [Singer F. et al., 2012] a dětí ve věku 3 – 18 let [Jensen R. et al., 2013]. Ve své práci Jensen et al. [Jensen R. et al., 2013] provedli porovnávání  $SF_6$ -MBW (přístroj AMIS 2000; Innovision A/S, Odense, Denmark s měřením koncentrace  $SF_6$  pomocí hmotnostního spektrometru) a  $N_2$ -MBW (přístroj Exhalyzer D, EcoMedics AG, Duernten, Switzerland se softwarem Spiroware 3.1., nepřímá metoda stanovení koncentrace  $N_2$ ) u 62 zdravých dětí a 61 pacientů s CF mimo kojenecký věk. Závěrem práce bylo, že mezi oběma metodami existuje dobrá shoda, nicméně  $FRC_{N_2}$  je vyšší než  $FRC_{SF_6}$ . Tyto rozdíly jsou výraznější u pacientů s CF ( $FRC_{N_2}$  je o 33 % vyšší než  $FRC_{SF_6}$ ) než u zdravých kontrol (rozdíl 21 %). U podskupiny pacientů nad 7 let věku byla k dispozici i bodyplety-smografická data, způsob jejich prezentace v publikaci však neumožňuje činit podrobnější závěry o vztahu

$FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{N_2}$ . Autoři pouze komentují, že „ $FRC_{N_2}$  měla těsnější vztah s  $FRC_{\text{box}}$  než  $FRC_{SF_6}$ “. Přesné statistické porovnání všech tří metod však není uvedeno.

Data z našeho souboru poskytují obdobné a zatím unikátní porovnání  $FRC_{\text{box}}$ ,  $FRC_{N_2}$  a  $FRC_{SF_6}$  v kojeneckém věku (s limitací absence zdravých kontrol). Výsledky potvrzují skutečnost popsanou u starších dětí, že bodyplety-smografická metoda poskytuje vyšší hodnoty FRC než  $SF_6$ -MBW. V souladu s výše popsanými technickými rozdíly mezi bodyplety-smografickým a dilučním měřením FRC přisuzujeme tento rozdíl (fyziologickému) fenoménu air-trapingu. Tuto hypotézu podporuje i vysoký stupeň korelace rozdílu mezi  $FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{SF_6}$  s  $LCI_{2,5SF_6}$ , který může představovat teoretické propojení míry air-trapingu (rozdíl  $FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{SF_6}$ ) s tíží postižení nejperifernějších dýchacích cest ( $LCI_{2,5SF_6}$ ). Ačkoliv design studie mi neumožňuje definitivně tento vztah potvrdit, považuji toto vysvětlení za vysoce pravděpodobné. Pro stanovení definitivních závěrů by bylo třeba doplnit např. data ze zobrazovacích metod morfologicky popisující míru air-trapingu.

Naše porovnání  $FRC_{\text{box}}$  a  $FRC_{N_2}$  statisticky významný rozdíl hodnot neprokázalo. To se jeví být v rozporu s fyziologickými aspekty měření, avšak do úvahy je nutno brát i technické aspekty měření. V této souvislosti je náš výsledek kompatibilní s pracemi vydanými po roce 2001. Jako možné vysvětlení diskrepance mezi fyziologickými principy a realitou měření danou technickými skutečnostmi je v literatuře diskutováno několik fenoménů, které mohou výsledky  $N_2$ -MBW zkreslit. V první řadě je to vliv hyperoxických podmínek během washout fáze na dechový vzor kojence. Po vystavení 100%  $O_2$  bylo u kojenců popsáno signifikantní snížení minutové ventilace zejména v důsledku poklesu dechového objemu [Cross K.W., Warner P., 1951], [Rigatto H. et al., 1981], [Bouferrache B. et al., 2000], [Singer F. et al., 2014]. Tomuto fenoménu se věnuji podrobněji v dalších částech práce. Snížení dechového objemu snižuje efektivitu vymývání dusíku z plic (zvyšuje ventilaci mrtvého prostoru na úkor alveolární ventilace) a může i měnit objemovou hladinu na konci výdechu (EEL), tedy FRC. Dalším fenoménem, který může zkreslovat výsledky  $N_2$ -MBW, je zpětná difuze dusíku z tkání zpět do alveolů [Nielsen N. et al., 2013], [Sullivan L. et al., 2017]. Jelikož je dusík rozpustný v krvi a tkáních, zejména při delším trvání washout fáze může docházet k jeho zpětné difuzi z tkání/krve do plic (ke konci washout fáze vzniká koncentrační gradient dusíku z tkání směrem do plic). S tímto fenoménem jsem se v klinické praxi velmi pravděpodobně setkal u několika kojenců s obliterující bronchiolitidou, u kterých během dusíkového washoutu vůbec nedošlo k poklesu koncentrace  $N_2$  pod stanovenou mez a i po více než deseti minutách jeho vyplavování neklesla koncentrace  $N_2$  ve vydechovaném vzduchu pod 2,5 %, ale pouze kolísala kolem této hranice. Naopak  $SF_6$ -MBW provedený

během stejné sedace bylo, byť po delší době, možné dokončit. Další skutečnost, která může zkreslovat výsledky  $N_2$ -MBW je i nepřímý způsob stanovení koncentrace dusíku během měření (viz kapitola 5.2.3. Vyšetření funkce plic.). Vzhledem ke skutečnosti, že koncentrace  $O_2$  a  $CO_2$  jsou měřeny v různých místech přístroje, dochází k časovému posunu jejich signálů. Navíc se tento časový posun může během měření měnit (změna fyzikálních vlastností plynu během washoutu v souvislosti se změnou jeho složení). To vše může vést k nepřesnému výpočtu koncentrace  $N_2$ , přičemž tyto nepřesnosti budou mít největší význam právě v kojeneckém věku. Závěrem tedy konstatuji, že stanovení FRC během  $N_2$ -MBW má potenciál k řadě zkreslení v důsledku různých fyziologických ale i technických aspektů. Nicméně na základě klinických zkušeností i výsledků předkládané práce jsem přesvědčen, že při znalosti výše zmíněných zkreslujících faktorů lze přesto využít parametr  $FRC_{N_2}$  v klinické praxi.

Dalším z výstupních parametrů MBW je očišťovací index plic (LCI). Obdobně jako v případě FRC, je v současné době živě diskutováno porovnání LCI měřeného pomocí  $N_2$ -MBW a  $SF_6$ -MBW. Naše data ukazují, že  $LCI_{2,5N_2}$  signifikantně převyšuje  $LCI_{2,5SF_6}$  (v průměru o 1,48 jednotky). Tento rozdíl je přímo úměrný velikosti  $LCI_{2,5SF_6}$ ,  $LCI_{2,5N_2}$  a  $FRC_{box}$  z-skóre. Z toho usuzuji, že velikost rozdílu  $LCI_{2,5}$  může záviset na tíži postižení nejperifernějších dýchacích cest.  $N_2$ -MBW má tedy tendenci nadhodnocovat nehomogenitu ventilace zejména u pacientů s těžkým postižením nejperifernějších dýchacích cest. Situace je tak obdobná jako v případě  $FRC_{N_2}$ , kdy se může uplatňovat právě fenomén zpětné difuze dusíku z tkání do plic a efekt přechodné hypoventilace.

U kojenců existují dosud pouze dvě práce přímo porovnávající  $LCI_{2,5N_2}$  a  $LCI_{2,5SF_6}$  [Gustafsson PM. et al., 2017] a [Koucký V. et al., 2018]. Gustafsson et al. u 10 zdravých kojenců během přirozeného spánku naměřili hodnoty  $LCI_{2,5N_2}$  v průměru o 0,7 vyšší než  $LCI_{2,5SF_6}$  ( $p = 0,021$ ). Průměrná hodnota  $LCI_{2,5N_2}$  u jejich zdravých kojenců byla  $8,25 \pm 0,85$ . Rozdíl mezi oběma parametry vztažený k  $LCI_{2,5N_2}$  činil 8,5 %. U našich pacientů byl rozdíl  $LCI_{2,5N_2}$  a  $LCI_{2,5SF_6}$  1,48 jednotky (13,2 %) a shoda mezi oběma parametry hodnocená dle Bland-Altmanova grafu výborná (pouze u 2 pacientů tzn. 5,3 % byly hodnoty mimo 95% interval spolehlivosti). Situace u starších dětí je konsistentní s těmito nálezy u kojenců. Jensen et al. [Jensen R. et al., 2013] u zdravých dětí ve věku 3 – 18 let naměřil  $LCI_{2,5N_2}$  v průměru o 0,61 vyšší než  $LCI_{2,5SF_6}$ ; u dětí s CF pak o 1,41. Pozorovali též korelaci mezi rozdílem  $LCI_{2,5N_2}$  a  $LCI_{2,5SF_6}$  a průměrnou hodnotou  $LCI_{2,5}$ . Závěrem tedy konstatuji, že ačkoliv obě metody nejsou zaměnitelné, shoda mezi oběma je vysoká a pro klinickou praxi lze zvolit právě jednu z nich.

Jelikož metoda MBW představuje časově poměrně náročné rozšíření vyšetřovacího programu iPFT, hodnotil jsem v předkládané disertační práci její přidanou informační hodnotu k ostatním metodám iPFT. Očist'ovací index plic jakožto hlavní výstupní parametr vyšetření MBW hodnotí průchodnost nejperifernějších dýchacích cest (12. generace a dále). To je založeno na posouzení efektivity intrapulmonálního míšení plynu (nehomogenity ventilace) [Becklake MR., 1952], [Robinson PD. et al., 2009]. Z teoretického hlediska se tím parametr LCI principiálně odlišuje od dalších ukazatelů průchodnosti dýchacích cest – jejich odporu ( $R_{aw}$ ) a maximálního průtoku na úrovni FRC ( $V'_{maxFRC}$  – tzn. ekvivalent spirometrických hodnot MEF). Tyto parametry hodnotí centrálněji umístěné etáže dýchacích cest. K posouzení jejich vzájemného vztahu jsem proto studoval korelaci  $LCI_{2,5N_2}$  resp.  $LCI_{2,5SF_6}$  s parametry  $R_{aw}\%$  a  $V'_{maxFRC}$  z-skóre. Mezi žádnými z parametrů signifikantní korelace nalezena nebyla. Vztah nebyl nalezen ani s parametrem  $tPTEF/tE$ , který popisuje časování expirace a nepřímo tak vypovídá o průchodnosti intratorakálních dýchacích cest [van der Ent CK. et al., 1996]. Na základě těchto výsledků usuzuji, že zmíněné parametry skutečně hodnotí různé aspekty funkce plic (průchodnost dýchacích cest na různých etážích) a má smysl tato vyšetření kombinovat. K obdobnému závěru dospěli i Lum et al [Lum S et al., 2007], kteří porovnávali přínos  $SF_6$ -MBW (výstupní parametr  $LCI_{2,5SF_6}$ ) a metodu RV-RTC (výstupní parametry  $FEV_{0,5}$  a  $FEF_{25-75}$ ). Zjistili, že pomocí alespoň jedné z metod byly detekovány abnormality funkce plic u 72 % kojenců s CF. Obě metody zároveň detekovaly abnormální plicní funkce u 41 % pacientů. Metody  $SF_6$ -MBW a RV-RTC byly tedy hodnoceny jako komplementární a bylo doporučeno provádět obě dvě současně.

Parametr  $R_{rs}$  měřený okluzní technikou hodnotí odpor celého dýchacího traktu. Z teoretického pohledu zahrnuje oproti odporu dýchacích cest ( $R_{aw}$ ) navíc i elastické odpory generované jak samotnou plící, tak i hrudní stěnou. Z tohoto důvodu nepřekvapí vyšší hodnota  $R_{rs}$  než  $R_{aw}$ . Jelikož v průběhu dětství a zvláště v období novorozeneckém a kojeneckém dochází v souvislosti s růstem k významným změnám v mechanice dýchacího traktu [Lanteri CJ., Sly PD., 1993], [Hanrahan JP. et al., 1996], lze očekávat korelaci mezi odporem (dýchacího traktu i dýchacích cest) a antropometrickými parametry. Naše výsledky demonstrují pokles  $R_{aw}$  i  $R_{rs}$  v souvislosti s rostoucím věkem, váhou i výškou. To dokládá fakt, že relativní průchodnost dýchacích cest v dětském věku stoupá. Dále jsme zjistili, že parametr  $\frac{R_{rs}-R_{aw}}{R_{rs}}$  vyjadřující podíl odporu plice a hrudní stěny na celkovém odporu dýchacího traktu se v kojeneckém věku výrazně nemění a pohybuje se kolem 50 %. Tato data lze porovnat s výsledky Lanteriho a kolektivu [Lanteri CJ, Sly PD., 1993], kteří

demonstrovali pokles  $R_{rs}$  s rostoucí výškou/délkou dítěte. Dále pomocí interrupční metody rozdělili  $R_{rs}$  na  $R_{aw}$  a „tkáňovou viskoelastickou komponentu odporu dýchacího traktu“ ( $P_{dif}$ ). Tato komponenta u dětí od 2 let věku mírně klesala, poté zhruba do 5 let věku narůstala.

### 7.3. Klinický význam parametrů iPFT

Všichni pacienti v našem souboru byli vyšetřeni z klinické indikace (na žádost ošetřujícího lékaře). Nezávisle na diagnostické skupině byla porucha funkce plic detekována u významné části pacientů (71,4 % dětí s opakovanými obstrukčními epizodami, 63,9 % pacientů s CF). To dokumentuje zavedenou praxi na našem pracovišti, že je iPFT prováděno pouze jako specializované vyšetření u pacientů s významnou respirační problematikou či nejasnou diferenciální diagnostikou. Určitou výjimku tvoří skupina CF<sub>malis</sub>, která zahrnuje vesměs asymptomatické děti s CF z novorozeneckého screeningu. V této skupině byl záchyt poruchy funkce plic nejnižší a vyšetření mělo za cíl především vytipovat rizikové pacienty vyžadující podrobnější sledování či intenzivnější intervence.

Ve skupině dětí s opakovanými obstrukčními epizodami byly nalezeny rozdíly ve funkci plic mezi pacienty rizikovými (pozitivní API) a nerizikovými (negativní API). Riziková pacienta měli signifikantně nižší maximální výdechové průtoky na hladině FRC ( $V'_{maxFRC}$ ) než děti nerizikové. To odpovídá těžší obstrukci periferních dýchacích cest ve skupině API+. Tato data jsou ve shodě s dříve publikovanými výsledky [Borrego LM. et al., 2009], [Keklikian E. et al., 2010]. Borrego et al. detekovali rozdíl ve funkci plic mezi kojenci s opakovanými obstrukčními epizodami a zdravými dětmi ve věku 8 – 20 měsíců pouze pomocí metody RV-RTC (signifikantně nižší parametry  $FEV_{0,5}$ ,  $FEF_{25}$  a  $FEF_{25-75}$ ), rozdíly ve  $V'_{maxFRC}$  z TV-RTC a parametrech klidového dechového vzoru nalezeny nebyly. Keklikian et al. naopak detekovali rozdíly mezi obdobně definovanými skupinami pacientů i pomocí parametru  $V'_{maxFRC}$ .

Pacienti z API+ podskupiny měli i vyšší nehomogenitu ventilace (dle parametru  $LCI_{2,5N_2}$ ), což svědčí pro výraznější postižení nejperifernějších dýchacích cest. Ačkoliv parametr  $LCI_{2,5N_2}$  k obdobným účelům dosud využit nebyl, existuje relativně recentní práce kanadských autorů [Lu Z. et al., 2018] využívající  $SF_6$ -MBW. Hodnoty  $LCI_{2,5SF_6}$  u pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami byly o 0,48 jednotky vyšší než u zdravých kontrol ( $LCI_{2,5SF_6} = 7,15$  vs.  $LCI_{2,5SF_6} = 6,74$ ,  $p < 0,05$ ), 19 % pacientů mělo  $LCI_{2,5SF_6}$  nad normu (z-skóre  $> 1,64$ ). Metoda  $N_2$ -MBW v našem studijním souboru detekovala podstatně vyšší hodnoty  $LCI_{2,5}$  (13,1 v API+ skupině, resp. 9,4 v API-). Tento rozdíl přisuzují v první řadě

dříve diskutovaným technickým rozdílem mezi oběma variantami MBW (v průměru bylo u pacientů ze skupiny AB LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> o 1,24 jednotky vyšší než z hexafluoridové varianty). Zbývající rozdíl pak přisuzují těžšímu postižení funkce plic u dětí v našem souboru.

Zajímavým nálezem je výrazný rozdíl ve výskytu zvýšených hodnot LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> mezi pacienty z podskupiny API+ a API-. Pokud byla hraniční hodnota LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> arbitrárně nastavena na 10,0, mělo v rizikové skupině 72,7 % pacientů zvýšené hodnoty LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub>, zatímco ve skupině API- to bylo jen 23,5 %. Tomu odpovídá vysoká specifita a senzitivita (~ 75%) parametru LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> pro riziko rozvoje astmatu dle API. Naopak ostatní funkční parametry takovýchto hodnot nedosahovaly – pro ilustraci viz V'maxFRC z-skóre, jehož senzitivita je sice srovnatelná se senzitivitou LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub>, diametrální rozdíl je však u specifity a obou prediktivních hodnot. Tento vztah mezi Asthma Predictive Index a parametrem LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> upozorňuje na potenciální význam N<sub>2</sub>-MBW pro vytipování pacientů v riziku rozvoje průduškového astmatu. K ověření prediktivního potenciálu LCI u pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami však bude nutno provést longitudinální studie sledující vztah mezi hodnotami LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> v raném dětství a pozdější diagnózou asthma bronchiale.

Výsledky vyšetření iPFT od 48 kojenců a batolat s cystickou fibrózou poskytují informaci o funkčním stavu dýchacího traktu zhruba poloviny všech českých CF pacientů narozených v letech 2013 – 2018. Ačkoliv se nejedná o klasickou prospektivní populační studii, tato funkční data doplněná o významné klinické charakteristiky onemocnění představují zajímavý zdroj informací o zdravotním stavu nejmladších dětí s CF. Podrobnou analýzu dat jsem uveřejnil v článku publikovaném v Česko-slovenské pediatrii [Koucký V. et al., Čes-slov Pediat 2019]. Součástí hodnocení bylo i posouzení reprezentativnosti vyšetřeného vzorku pacientů pro obecnou českou populaci kojenců a batolat s CF. Referenční soubor tvořilo 89 pacientů s klasickou formou CF a rokem narození 2013 – 2017 evidovaných v českém registru cystické fibrózy. Na základě porovnání bylo konstatováno, že vyšetřený soubor pacientů není plně reprezentativní. Je totiž přítomna výběrová nevyváženost (selekční bias), kdy k vyšetření byli indikováni především pacienti s těžším klinickým průběhem onemocnění (např. vyšší výskyt poruchy výživy – 22,9 % u vyšetřených vs. 9,0 % v obecné populaci,  $p = 0,025$ ). Výsledky z našeho souboru pacientů tedy není možné beze zbytku přenášet na obecnou českou populaci, nicméně představují zajímavý zdroj informací o zdravotním stavu našich nejmladších pacientů s cystickou fibrózou a lze je využít k optimalizaci léčebného přístupu k těmto dětem.

Abnormality ve funkci plic jsem v předkládaném souboru zjistil již u dětí ve věku kolem 2 měsíců života. U skupiny mladších dětí ( $CF_{\text{malí}}$ , věk < 6 měsíců) se alespoň jeden typ funkční poruchy plic vyskytl u 42 %, u starších dětí pak u 75 % pacientů. Nejčastěji byla detekována zvýšená nehomogenita ventilace ( $LCI_{2,5N_2}$  nad 10), dále hyperinflace plic, obstrukce periferních dýchacích cest a jejich různé kombinace (klasická obstrukční ventilační porucha). Výsledky této analýzy jsem porovnal s daty z rozsáhlých prospektivních populačních studií (kohorta narození) – londýnské (LCFC – London Cystic Fibrosis Colaboration) a australské (AREST CF – Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis). Londýnští autoři [Nguyen TT. et al., 2014] – ve shodě s našimi daty – prokázali přítomnost poruchy funkce plic v časných stádiích onemocnění (záhy po stanovení diagnózy CF – tzn. ve věku cca 3 měsíců). Dvacet jedna procent tříměsíčních kojenců mělo v jejich studii zvýšenou nehomogenitu ventilace ( $LCI_{2,5SF_6}$  vyšší než horní hranice normy zdravých kontrol), v našem souboru to bylo 25 %. Funkční reziduální kapacita byla oproti zdravým kontrolám též signifikantně zvýšená, přičemž hyperinflace plic (zde definovaná jako z-skóre  $FRC > 1,96 \sigma$ ) byla zjištěna u 18 % pacientů (u nás 20 % ve skupině  $CF_{\text{malí}}$ ). Usilovné průtoky stanovené modifikací metody torakoabdominální komprese byly oproti kontrolám významně snižené, přičemž obstrukce periferních dýchacích cest (z-skóre  $FEV_{0,5} < -1,96 \sigma$ ) byla detekována u 25 % pacientů. Tyto výsledky jsou plně srovnatelné s výsledky naší podskupiny  $CF_{\text{malí}}$  (průměrný věk 8,1 týdne).

V práci londýnských autorů byl též hodnocen vývoj vybraných parametrů funkce plic mezi 3. a 12. měsícem života. Bylo konstatováno zlepšení obstrukce periferních dýchacích cest, naopak parametry plicní hyperinflace a nehomogenity ventilace (z-skóre FRC a  $LCI_{2,5}$ ) zůstaly stacionární. V roce 2017 pak vyšla další práce [Davies G. et al., 2017] hodnotící vývoj pacientů z předchozí studie v průběhu dalšího roku života (ve 24 měsících věku). Byl potvrzen zlepšující se trend parametru  $FEV_{0,5}$  (zlepšení na úroveň zdravých kontrol), zatímco z-skóre  $LCI_{SF_6}$  zůstalo nadále snižené. Ačkoliv naše studie nebyla koncipována jako prospektivní, lze určitou představu o progresi onemocnění získat na základě porovnání podskupiny  $CF_{\text{velcí}}$  a  $CF_{\text{malí}}$ . Vzhledem k významně horší funkci plic u dětí ze skupiny  $CF_{\text{velcí}}$  než  $CF_{\text{malí}}$  dovozují, že u českých CF kojenců dochází k progresi funkčního deficitu již v takto časném věku. To je sice v rozporu s londýnskými autory [Nguyen TT. et al., 2014], [Davies G. et al., 2017]), ale ve shodě s australskými daty [Pillarsetti N. et al., 2011], které též ukazují progresi plicního postižení v průběhu prvních 2 let života. Australští autoři demonstrovali významné zhoršení plicního postižení i na HRCT plic u dětí v rozmezí 0,2 – 6,5 let [Mott LS. et al., 2012]. Podotýkám však, že srovnání našich dat s výše zmíněnými

studiemi má několik limitací. Naše práce nemá longitudinální charakter, dále chybí referenční skupina zdravých kojenců. Je třeba brát v potaz i odlišné aspekty dlouhodobé léčby pacientů s CF v Austrálii a Spojeném království (např. profylaxe infekce *Staphylococcus aureus* flucloxacilinem).

Zjištění, že v průběhu prvních 2 let života dochází k významné progresi deficitu funkce plic, je konzistentní s klinicky vypozařovanou skutečností, která říká, že kojenecké a batolecí období je kritické pro další vývoj nemocnosti pacientů s CF a jejich prognózu (tzv. okno léčebné příležitosti – „window of treatment opportunity“). Nepřímo tak dokládá i smysluplnost snah o časně stanovení diagnózy CF. Samotný fakt významné progresy plicního postižení u nejmladších dětí s CF představuje nepříznivé zjištění. Za zmínku však v této souvislosti stojí naše longitudinální data od 12 pacientů s CF a zvláště těžkým klinickým průběhem onemocnění, kteří byli ve vazbě na zintenzivnění léčebného režimu vyšetřeni opakovaně. V této skupině jsem prokázal zlepšení vybraných parametrů funkce plic, což dokládá efektivitu našich léčebných možností a také potenciální význam vyšetření iPFT pro vytipování rizikových pacientů, kteří by pak mohli podstoupit intenzivnější léčbu. Toto zjištění považuji za významné pro klinickou praxi a je aktuálně diskutováno v rámci české pracovní skupiny pro CF s ohledem na možnou úpravu léčebného protokolu kojenců a batolat s CF.

Kombinace řady anamnestických údajů s výsledky funkčního vyšetření plic u pacientů s cystickou fibrózou mi v průřezové studii umožnila orientačně posoudit vliv různých klinických aspektů onemocnění na funkční stav dýchacího traktu. Porovnáním klinicky definovaných podskupin jsem nenašel rozdíl ve funkci plic u pacientů pankreaticky insuficientních a pacientů pankreaticky suficientních. U dospělých a starších dětí s CF je pankreatická insuficience považována za známku těžšího průběhu onemocnění a bylo opakovaně prokázáno, že pankreaticky insuficientní jedinci mají horší plicní funkce a v longitudinálních studiích i rychlejší pokles FEV<sub>1</sub> než pankreaticky suficientní jedinci [Loubières Y. et al., 2002], [Schadel C. et al., 2002], [Kerem E. et al., 2014]. Naše data od malých dětí s trváním nemoci cca 1 rok tento trend nepotvrdila. Jako nejpravděpodobnější vysvětlení této diskrepance se jeví krátké trvání nemoci, během kterého se zatím vliv pankreatické insuficience neprojevil. V potaz je však třeba brát i metodické aspekty – malý počet pankreaticky suficientních pacientů v souboru (nedostatečná síla vzorku) a průřezový design naší studie neumožňující hodnotit dynamiku plicních funkcí. Složitější situace je v případě mekoniového ileu, kdy data od starších pacientů z různých pracovišť si protiřečí. Existuje několik studií, které prokázaly negativní vztah mezi plicními funkcemi (FEV<sub>1</sub>, resp.



ročním poklesem FEV<sub>1</sub>) a anamnézou mekoniového ileu [Doulgeraki A. et al., 2017], [Evans AK. et al., 2001] a [Li Z. et al., 2004]. Naopak v novější práci londýnští autoři [Johnson JA. et al., 2010] studovali rozdíl v prognóze onemocnění mezi pacienty s mekoniovým ileem a bez něj. Významným metodickým aspektem jejich práce byla rozsáhlá adjustace zjištěných rozdílů mezi skupinami na genotyp, pohlaví, pankreatickou dysfunkci, věk při diagnóze a chronickou kolonizaci *Pseudomonas aeruginosa*. Tímto způsobem nebyl zjištěn významný rozdíl v plicních funkcích ani růstových charakteristikách mezi pacienty s mekoniovým ileem a bez něj. Ačkoliv jsem, vzhledem k počtu pacientů v našem souboru (pouze 8 s mekoniovým ileem), neprováděl adjustaci zjištěných rozdílů mezi oběma skupinami dětí na další klinické charakteristiky, jsou tato data ve shodě s posledně jmenovanou prací a v kojeneckém a časném batolecím věku anamnéza mekoniového ileu velmi pravděpodobně nemá vliv na funkci dýchacího traktu. Opět se však může uplatňovat malá síla vyšetřeného vzorku pacientů.

Naše data jasně dokládají významný negativní vliv respiračních exacerbací na funkční stav dýchacího traktu již v nejnižších věkových kategoriích pacientů s CF. Signifikantně horší plicní funkce byly detekovány u pacientů, kteří prodělali respirační exacerbaci (ať již byly brány v potaz dohromady lehké a těžké exacerbace nebo jen těžké exacerbace samostatně). Exacerbace měly vliv především na nehomogenitu ventilace (LCI<sub>2,5</sub>), hyperinflaci plic (FRC<sub>box</sub>) a průchodnost dýchacích cest (R<sub>aw</sub>). Význam exacerbací na plicní funkce dokresluje i signifikantní vztah mezi počtem dní užívání p.o. ATB na respirační symptomy a parametry funkce plic. S narůstajícím počtem dnů léčby docházelo ke zhoršování plicních funkcí. V naší práci jsem použil klinickou definici akutní respirační exacerbace (viz kapitola 5.2.1. Anamnestické údaje). Tento přístup se odlišuje od několika dalších dostupných publikací hodnotících vztah mezi plicními funkcemi a infekcí resp. zánětem [Pillarisetti N. et al., 2011], [Simpson SJ. et al., 2015]. Tyto práce definují infekci jako přítomnost infekčního agens v tekutině bronchoalveolární laváže (BALF) a zánět na základě cytologie BALF, event. i průkazu prozánětlivých mediátorů v něm (např. volná neutrofilní elastáza, interleukin 8 atd.). Ačkoliv tento přístup je přesnější a sofistikovanější, naše výsledky mají blíže k běžné praxi, kdy je všeobecně využívána právě klinická definice exacerbace. Avšak i navzdory mírně odlišné metodice jsou tyto výsledky ve shodě s dříve publikovanými pracemi. Simpson et al. [Simpson SJ. et al., 2015] detekovali u pacientů s aktivní infekcí dle kultivace BALF (> 10<sup>5</sup> kolonie formujících jednotek) LCI<sub>2,5</sub> o 0,4 jednotky vyšší než u dětí bez zjištěné infekce. Efekt prodělané infekce byl dlouhodobý, kdy zvýšené LCI<sub>2,5</sub> přetrvávalo i po prodělané infekci (u těchto pacientů bylo o 0,7 jednotky vyšší než u těch, kteří nikdy infekci

neprodělali). K obdobnému závěru dospěli Pillarisetti et al. [Pillarisetti N. et al., 2011], kteří prokázali signifikantně horší plicní funkce (z-skóre FEV<sub>0,5</sub> a FVC z RV-RTC) u pacientů se zvýšenou volnou neutrofilní elastázou v BALF jakožto markerem aktivního zánětu. Též dynamika plicních funkcí (vývoj mezi 3. a 12. měsícem života) byla horší u pacientů s prokázanou infekcí (rychlejší pokles z-skóre FEV<sub>0,5</sub> ve sledovaném období). Ve vyšším věku je pak efekt akutních exacerbací na funkci plic jednoznačně dokumentován řadou dalších prací [Sanders DB. et al., 2011], [Waters V. et al., 2012], [de Boer K. et al., 2011].

Rozdíly ve funkci plic – byť méně významné – byly zaznamenány i mezi pacienty s různou mikrobiální kolonizací. V případě infekce *Pseudomonas aeruginosa* měl intermitentní záchyt tohoto patogenu negativní vliv na funkci plic. U těchto pacientů jsem zaznamenal signifikantně vyšší nehomogenitu ventilace. Pillarisetti a kolektiv [Pillarisetti N. et al., 2011], kteří studovali pomocí metody RV-RTC funkci plic v souvislosti s kultivačním nálezem v BALF provedeném do 48 hod po vyšetření iPFT ukázali, že z-skóre FEV<sub>0,5</sub> je u pacientů s kultivačním nálezem v BALF nižší. Nehomogenita ventilace hodnocená pomocí MBW v této práci vyšetřena sice nebyla, ale z obecného pohledu lze konstatovat, že tito autoři též našli rozdíl ve funkci plic mezi skupinami pacientů definovanými na základě mikrobiologických nálezů. Určitou limitací naší studie v porovnání s dříve zmiňovanou prací je vyšetření materiálu z horních cest dýchacích, kdy záchyt patogenů ve vzorcích horních cest dýchacích neodpovídá záchytu v dolních cestách dýchacích [Bonestroo HJ. et al., 2010]. V tomto ohledu je vyšetření BALF považováno za zlatý standard pro hodnocení kolonizace DCD, nicméně Rosenfeld et al. [Rosenfeld M. et al., 1999] ukázali vysokou specifitu a negativní prediktivní hodnotu kultivace HCD pro záchyt *Pseudomonas aeruginosa* v DCD. Důsledkem našeho použití vzorků z HCD je tedy potencionální snížení síly souboru pro průkaz rozdílu v plicních funkcích, jelikož část z našich *PsA+* pacientů mohla mít pouze kolonizaci HCD a ta velmi pravděpodobně neovlivňuje nehomogenitu ventilace. Na druhou stranu zjištění, že záchyt *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích z HCD je spojen s horšími plicními funkcemi je klinický významný, jelikož v běžné praxi je k rutinnímu použití doporučován právě tento materiál. Další výhodou naší práce je longitudinální hodnocení kultivačních nálezů z HCD, kdy u většiny pacientů byly vzorky vyšetřovány každé 3 měsíce. Vliv infekce *Pseudomonas aeruginosa* na plicní funkce dokresluje i práce Taccetti et al. [Taccetti G. et al., 2005], kteří prokázali, že časná eradikace *Pseudomonas aeruginosa* u dětských pacientů zpomaluje pokles plicních funkcí.

Významný vliv na funkci plic měla i infekce *Staphylococcus aureus*. U intermitentního záchytu jsme sice nenašli signifikantní rozdíl v plicních funkcích, avšak

v případě chronického záchytu jsme, obdobně jako u *Pseudomonas aeruginosa*, našli vyšší nehomogenitu ventilace. Obdobně tak Pillarsetti a kolektiv v dříve zmíněné práci [Pillarsetti N. et al., 2011] zjistili, že kojenci a batolata, u kterých byl v BALF prokázán *Staphylococcus aureus*, měli horší plicní funkce (z-skóre FEV<sub>0,5</sub>). Zajímavý je náš náález ukazující, že přítomnost *Staphylococcus aureus* měla vliv na plicní funkce pouze v případě chronické infekce, zatímco u *Pseudomonas aeruginosa* byl významný již intermitentní záchyt. V této souvislosti zmiňují některé nálezy od starších dětí a dospělých, které ukazují, že přítomnost *Staphylococcus aureus* bez záchytu *Pseudomonas aeruginosa* může být známkou mírnějšího průběhu nemoci [Ahlgren HG. et al., 2015]. Obdobně tak Liou et al. [Liou TG. et al., 2001] ve svém prediktivním modelu přežití pacientů s CF ukázali, že infekce *Staphylococcus aureus* je spojená s lepším 5letým přežíváním. Významný se v této souvislosti jeví i náález z randomizované, prospektivní, kontrolované ale nezaslepené studie z roku 1994 [Beardsmore CS. et al., 1994], která nenašla rozdíl v plicních funkcích kojenců na profylaktické léčbě flucloxacilinem a kojenců bez této profylaxe (léčených pouze na základě klinických příznaků). Všechny tyto nálezy považujeme za významné pro rozhodování o zavedení profylaxe *Staphylococcus aureus* v prvních letech života u pacientů s CF. Nutno konstatovat, že metaanalýzy zabývající se významem této profylaxe neukazují její jednoznačný benefit stran plicních funkcí, stavu výživy ani počtu hospitalizací [Smyth AR, Rosenfeld M., 2017].

Výsledky vyšetření iPFT u pacientů s dalšími diagnózami jsem do dizertační práce zahrnul s cílem demonstrovat typické funkční nálezy u těchto dětí. Vzhledem k nízkému počtu zařazených pacientů nebyla data zpracována statisticky a jsou prezentována spíše jako kasuistická sdělení. V dostupné literatuře existuje jen minimum obdobných studií, které by mohly být s našimi výsledky porovnány. Koumbourlis et al. [Koumbourlis AC. et al., 2006] vyšetřili plicní funkce u 56 dětí po chirurgické korekci brániční kýly ve věku do 2 let. U 21 dětí byla k dispozici opakovaná měření. Pacienti byli rozděleni do 4 věkových skupin (0 – 3, 4 – 6, 6 – 12 a 12 – 24 měsíců), mezi kterými byly porovnány z-skóre parametrů FRC, C<sub>rs</sub>, R<sub>rs</sub> a V'maxFRC. Ačkoliv má tato studie řadu metodických limitací, lze na základě těchto dat konstatovat, že v průběhu prvních 2 let došlo ke zlepšení sledovaných parametrů funkce plic. V nižších věkových kategoriích byl významně zvýšený odpor dýchacího traktu (z-skóre R<sub>rs</sub> 2,85) spolu s lehce redukovanými maximálními průtoky na hladině FRC (z-skóre V'maxFRC -1,63), z-skóre FRC a C<sub>rs</sub> byly jen lehce podprůměrné (-0,84, resp. -0,87). S narůstajícím věkem došlo k úpravě všech parametrů do normy s výjimkou FRC, jejíž z-skóre ve věkové skupině 12 – 24 měsíců bylo 3,26. Lze tedy konstatovat, že u nezanedbatelné části pacientů po CDH se může vyskytovat obstrukční ventilační porucha. Porovnání s našimi daty je jen

omezeně proveditelné, jelikož nejsou udávány absolutní hodnoty měřených parametrů a použité normy v dnešní době nejsou již aktuální, nicméně též v našem souboru byla nalezena obstrukce dýchacích cest u významné části CDH pacientů. Další práce hodnotící funkci plic u pacientů po chirurgické korekci brániční hernie byla provedena na skupině 8 intubovaných novorozenců a 6 zdravých kontrol [Nakayama D. et al., 1991]. V této práci zjistili autoři u pacientů po brániční kýle nižší hodnoty forsírované vitální kapacity (FVC) i poddajnosti dýchacího traktu ( $C_{rs}$ ) než u zdravých kontrol. Zajímavým nálezem však byly snížené průtoky v periferních dýchacích cestách ( $MEF_{25}$ ) s významnou odezvou na salbutamol svědčící o reversibilní obstrukci periferních dýchacích cest v bezprostředním pooperačním období. Reversibilitu obstrukce se mi u našich pacientů však nepodařilo zhodnotit.

Informace o poruše funkce plic u malých dětí s intersticiálním plicním postižením jsou v literatuře velmi omezené. Nejvíce dat je od pacientů s hyperplazií neuroendokrinních buněk (NEHI a NEHI syndrom) [Kerby GS. et al., 2013], [Young LR. et al.,]. Zde je popisována výrazná obstrukční ventilační porucha se snížením průtoků v periferních dýchacích cestách, hyperinflací a air-trapíngem. Vyšetření iPFT má i určitou prediktivní hodnotu pro pozdější funkci plic u těchto dětí (spirometrie a saturace hemoglobinu kyslíkem v předškolním věku). Vyšetření plicních funkcí může mít v této skupině i diagnostickou hodnotu, kdy je u pacientů s typickým funkčním a radiologickým nálezem možno vynechat plicní biopsii (tzv. NEHI syndrom). Výsledky jedné naší pacientky popisují ve shodě s dříve zmíněnými pracemi těžkou obstrukční ventilační poruchu. Velmi těžká obstrukční ventilační porucha se vyskytovala i u našich pacientů se susp. postinfekční obliterující bronchiolitidou. V dostupné literatuře se mi sice zatím nepodařilo najít práci zabývající se funkčním postižením kojenců s touto diagnózou, nicméně u starších dětí je tento typ postižení dobře znám – např. [Colom AJ. et al., 2015]. Funkční nález u jedné naší pacientky s plicním postižením při histiocytóze z Langerhansových buněk nebyl charakteristický, nicméně vykazoval některé rysy restriktivní ventilační poruchy. To je ve shodě s prací autorů Ha et al. [Ha SY. et al., 1992]. U pacientů s dalšími typy chILD jsou též popisovány většinou restriktivní typy poruch ventilace – např. u deficitu surfaktantového proteinu C [Hevroni A. et al., 2015] a plicní intersticiální glykogenózy [Ehsan Z. et al., 2014]. Tito pacienti se však v našem souboru nevyskytovali.

Časně stanovení diagnózy primární ciliární dyskineze je vzhledem k epidemiologii nemoci, jejím klinickým příznakům a nedostupnosti jednoduchého screeningového nástroje mimořádně složité. V řadě případů jsou kojenci s PCD buď asymptomatictí, nebo vedeni pod jinými diagnózami (např. neurčená chronická bronchitida, astma, atd.) a skutečná příčina

obtíží je odhalena až v pozdějším věku (v ČR kolem 9 roku života). V této době už bývá plně vyjádřeno strukturální i funkční plicní postižení, přičemž část změn je již ireversibilních. Naši 3 kojenci s PCD představují světlé výjimky, avšak již v tomto nízkém věku byla u jednoho pacienta přítomna zvýšená nehomogenita ventilace. V dostupné literatuře zatím existuje pouze jedno kazuistické sdělení popisující funkce plic a CT nález u 3 pacientů s PCD ve věku 29, 33 a 42 měsíců [Brown DE. et al., 2008]. U všech třech bylo zjištěno snížení usilovné vitální kapacity (FVC) a průtoků v periferních dýchacích cestách ( $FEV_{0,5}$  a  $MMEF_{75-25}$ ). U dvou pak i hyperinflace plicní. Na CT již počínající bronchiektázie. Tato zjištění dokládají význam časného stanovení diagnózy PCD pro další prognózu pacienta.

#### **7.4. Ventilační odpověď na hyperoxii**

Ventilační odpověď kojenců na hyperoxii představuje málo prostudovanou oblast respirační fyziologie. Dosavadní práce se zabývaly především ventilační odpovědí nedonošených dětí na hyperoxii s cílem studovat funkci jejich periferních chemoreceptorů. U pacientů s bronchopulmonální dysplázií resp. chronickou plicní nemocí nedonošených (CLDI – chronic lung disease of infancy) byla prokázána dysfunkce karotických tělísek – chybění klasické bifazické odpovědi – v novorozeneckém a časném kojeneckém věku [Katz-Salamon M. et al., 1995]. V další práci Katz-Salamon M. se spoluautory [Katz-Salamon M. et al., 1996] však ukázal, že se i u těchto pacientů ventilační odpověď na hyperoxii objevuje, nicméně opožděně (v průměru ve 13 týdnech věku, nejdéle v 8 měsících). V roce 2007 Cardot et al. [Cardot V. et al., 2007] zjistili, že frekvence apnoických epizod u předčasně narozených novorozenců/kojenců přímo souvisí s dysfunkcí periferních chemoreceptorů (posuzováno 30ti sekundovým hyperoxickým testem). Na základě těchto nálezů se předpokládá, že dysfunkce periferních chemoreceptorů může být jedním z významných, avšak přechodně působících faktorů zodpovědných za syndrom náhlého úmrtí kojence (SIDS – sudden infant death syndrome) [MacFarlane PM. et al., 2013], [Porzionato A. et al., 2013].

Porucha funkce karotických tělísek byla též studována u dalších stavů – např. kardiovaskulárních onemocnění [Garvey JF. et al., 2009] [199] či syndrom ROHHAD (Rapid-Onset Obesity With Hypothalamic Dysfunction, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation) [Carroll MS. et al., 2015]. Informace o funkci periferních chemoreceptorů v pozdějším věku (u starších kojenců a batolat) a u jiných diagnóz (např. cystická fibróza) však zcela chybí. Existuje pouze jedna práce z roku 1977 zabývající se morfologií karotických tělísek u pacientů s chronickou hypoxemií [Lack EE., 1977]. U pacientů

s pokročilými formami CF byly zjištěny jejich strukturální změny ve smyslu hypertrofie a změn zastoupení stromatu a „hlavních“ buněk, což ukazuje na jejich chronickou stimulaci. Samotné funkční aspekty však vzhledem k designu studie hodnoceny nebyly. Otázka funkce periferních chemoreceptorů u těchto pacientů je však důležitá nejen z patofyziologického pohledu, ale i v souvislosti s použitím 100% kyslíku v rámci washout fáze N<sub>2</sub>-MBW. Změny dechového vzoru po expozici 100% kyslíku jsou považovány za jeden z důvodů, proč je LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub> vyšší než LCI<sub>2,5SF<sub>6</sub></sub> [Singer F. et al., 2014], [Gustafsson PM. et al., 2017], [Rigatto H. et al., 1981] – diskutováno v kapitole 6.2. Vzájemný vztah mezi vybranými parametry funkce plic

V rámci předkládané dizertační práce prezentuji prvotní výsledky analýzy, která byla provedena za použití vlastního, nekomerčně vyvinutého software. S jeho pomocí se nám podařilo prokázat bifázickou odpověď u většiny (cca 2/3) pacientů jak s CF, tak opakovanými obstrukčními epizodami. Analyzováni byli pouze pacienti s negativní perinatální anamnézou s cílem eliminovat potenciální vliv známých „matoucích“ faktorů (confounding) – viz výše. Rozdíly byly nalezeny i v rychlosti, s jakou ventilační odpověď nastala, a v jejím rozsahu - u CF pacientů byla významně opožděná (delší HRT1) a hlubší (výraznější pokles VE v období hyperoxie). Dále je též nápadné, že opožděná ventilační odpověď na hyperoxii má tendenci u pacientů s CF perzistovat, zatímco u pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami se s věkem zmírňuje (viz závislost HRT1 na stáří pacienta ve skupině API-). To vše může ukazovat na vyšší bazální aktivitu karotických tělísek a jejich nižší citlivost na změny parciálního tlaku kyslíku v krvi (p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>) specificky u pacientů s CF. O možných příčinách této abnormální funkce lze na základě naší studie a dalších literárních údajů pouze spekulovat. K chronické stimulaci karotických tělísek a jejich následné dysfunkci by mohly přispívat opakované subklinické epizody desaturací u kojenců s CF. Nabízí se též možnost ovlivnění funkce chromafinních buněk dysfunkčním CFTR kanálem, avšak údaje o expresi tohoto genu v karotických tělískách se mi nepodařilo v literatuře dohledat.

Předkládaná studie o vlivu hyperoxie na ventilaci u kojenců s CF má řadu limitací. Chybí skupina zdravých dětí jako kontrol. Místo ní byli pacienti s CF porovnání s pacienty s opakovanými obstrukčními epizodami (podskupinou API-). Ačkoliv lze u těchto dětí předpokládat méně závažnou respirační patologii (viz anamnestické údaje a výsledky funkční analýzy), stále nelze vyloučit určité reziduální postižení jejich karotických tělísek, což může snížit diskriminativní potenciál naší analýzy. Jednotlivé parametry charakterizující ventilační odpověď na hyperoxii vykazovaly v obou skupinách vysokou variabilitu (i při manuálním vyloučení odlehlých měření byla stále téměř 20 %). To snižuje jejich potenciál pro detekci

rozdílů mezi skupinami a také limituje využití těchto parametrů v klinické praxi. Z tohoto důvodu bude třeba se zabývat alternativními parametry, respektive způsoby jejich výpočtu, které zajistí jejich větší robustnost (např. [Bouferrache B. et al., 2000]). Vzhledem k designu studie se též nelze podrobněji vyjádřit k patofyziologickým mechanismům zodpovídajícím za abnormální funkci periferních chemoreceptorů u pacientů s CF. Optimální by bylo paralelní vyšetření morfologie karotických tělísek, což je v reálné praxi neproveditelné. Závěrem však konstatuji, že navzdory výše zmíněným limitacím+ by po určitých úpravách mohl být navržený software cenným nástrojem pro hodnocení funkce periferních chemoreceptorů u různých pacientů s respiračním onemocněním. To přispěje k pochopení patofyziologie časných změn dýchání u kojenců s chronickým plicním onemocněním a dále pomůže vyjasnit některé technické aspekty vyšetření N<sub>2</sub>-MBW.

## **7.5. Remodelace sliznice dýchacích cest a její vztah k funkci plic**

Morfologická analýza vzorků endobronchiálních biopsií od 11 pacientů a 5 kontrol ve věku do 2 let provedená v rámci předkládané dizertační práce měla za cíl v první řadě demonstrovat bezpečnost a proveditelnost tohoto vyšetření (viz výše). Dalším cílem bylo posouzení přítomnosti remodelačních změn ve vzorcích EBB a jejich vztah k funkčnímu postižení.

Navzdory poměrně malému rozsahu bioptického vzorku jsem byl schopen na endobronchiálních preparátech hodnotit několik různých aspektů remodelace dýchacích cest – zejména kvalitativní a kvantitativní změny bazální membrány a celulizaci lamina propria mucosae. Hodnocení dalších strukturálních změn postihujících povrchový epitel a hladkou svalovinu bylo možné pouze u malé části pacientů (méně než u 1/3) a pro běžnou praxi se mi tedy nejeví plně využitelné.

Nejlépe prostudovanou oblastí remodelace dýchacích cest u dětí s chronickým respiračním onemocněním jsou změny bazální membrány. Ačkoliv dříve byly tyto změny popisovány jako typické pro pacienty s asthma bronchiale (eozinofilní zánět) [Payne DN. et al., 2003], novější práce ukazují, že se mohou vyskytovat i u onemocnění charakterizovaných neutrofilním zánětem [Hilliard TN. et al., 2007], [Hoňková L. et al., 2014]. Ve shodě s dříve publikovanými pracemi [Hilliard TN. et al., 2007], [Hoňková L. et al., 2014], [Saglan S. et al., 2007] jsem u pacientů s CF, PCD a AB zjistil zřetelně silnější bazální membránu oproti kontrolám, která navzdory malému počtu vyšetřených pacientů dosáhla též statistické významnosti. Téměř dvojnásobná šířka bazální membrány u pacientů s chronickým

respiračním onemocněním svědčí i o klinické relevanci tohoto rozdílu. Konkrétní hodnoty zjištěné u našich pacientů s CF byly mírně nižší než v práci [Hilliard TN. et al., 2007], kde autoři udávají 5,9  $\mu\text{m}$  (oproti našim 4,4  $\mu\text{m}$ ). Zde se však jednalo o starší pacienty (průměrný věk 6,2 let) s významným deficitem funkce plic (průměrná hodnota  $\text{FEV}_1$  u pacientů schopných provést spirometrii dosahovala 60 % normy). Naopak hodnoty registrované u našich pacientů s opakovanými obstrukčními epizodami a rizikem rozvoje astmatu (4,7  $\mu\text{m}$ ) se plně shodují s hodnotami udávané v práci [Saglani S. et al., 2007], kde byly hodnoceny děti ve věkovém rozmezí 3 měsíce až 5 let a zjištěná šířka bazální membrány byla 4,6  $\mu\text{m}$  u pacientů s opakovanými pískoty potvrzenými videonahrávkou (confirmed wheezers).

Velmi zajímavý je též nálezní těsného vztahu mezi šířkou bazální membrány a nehomogenitou ventilace posuzovanou na základě  $\text{LCI}_{2,5\text{N}_2}$  u pacientů s chronickým neutrofilním zánětem (CF+PCD). Takto těsnou závislost jsem naopak nenalezl u kontrol bez patologie dolních cest dýchacích ani u pacientů s AB. Nalezený vztah mezi deficitem funkce plic a remodelací stěny dýchacích cest obecně je v literatuře ojedinělý. Ačkoliv vztah poruchy funkce plic a makroskopických strukturálních změn podle zobrazovacích metod [Gustafsson PM. et al., 2008] či zánětlivých změn v tekutině bronchoalveolární laváže (BALF) [Ramsey KA. et al., 2017] byl již prokázán, vztah mezi poruchou funkce plic a mikroskopickými změnami přímo ve stěně dýchacích cest (šířka bazální membrány) zatím nalezen nebyl [Hilliard TN. et al., 2007], [Hoňková L. et al., 2014]. Tyto studie však k hodnocení funkce plic využívaly pouze spirometrii. Vzhledem k její nízké senzitivitě k postižení nejperifernějších dýchacích cest však lze spekulovat, že absence vztahu morfologických změn a funkčního postižení může být dána pouze technickými aspekty studie a nikoliv jeho skutečným chyběním. Použití  $\text{N}_2$ -MBW se mi proto v kontextu cílů naší práce jeví jako plně indikované a zásadní. Získané výsledky od nejmladších dětí naznačují, že rozsah strukturálních změn bazální membrány může mít přímý vztah k funkčnímu deficitu a může tak být jedním z nástrojů pro hodnocení rozsahu chronického plicního postižení daného pacienta. Toto zjištění jsme dále rozpracovali v článku [Koucký V. et al., Chest 2019], do kterého byli zahrnuti pacienti s CF, PCD, AB a „zdravé“ kontroly ve věkovém rozmezí 0,5 – 18,1 let. Zatímco šířka bazální membrány se mezi pacienty s neutrofilním (CF+PCD) a eozinofilním (AB) zánětem nelišila, funkční deficit byl výraznější u CF a PCD pacientů. V této skupině jsme navíc našli signifikantní korelaci mezi šířkou bazální membrány a parametrem  $\text{LCI}_{2,5\text{N}_2}$ . Naopak u pacientů s asthma bronchiale tento vztah nalezen nebyl. Tyto výsledky podporují naši teorii o vzájemné provázanosti morfologické remodelace dýchacích cest a funkčního deficitu pacientů s CF a PCD. Jsem přesvědčen, že toto zjištění může mít



přímý dopad do klinické praxe a představuje jeden z dalších směrů výzkumu v oblasti remodelace dýchacích cest.

## 7.6. Shrnutí praktické části práce

V praktické části dizertační práce je hodnocena bezpečnost, proveditelnost a technické aspekty metod iPFT a EBB. Jedná se diagnostické nástroje nově pronikající do klinické praxe, metody N<sub>2</sub>-MBW a SF<sub>6</sub>-MBW byly v České republice zavedeny právě v rámci doktorského studia autora. Na unikátním vzorku 95 kojenců a batolat s chronickým respiračním onemocněním, resp. v riziku jeho vzniku, studuji také vztah mezi výsledky funkčního vyšetření a různými klinickými charakteristikami vyšetřovaných pacientů. Takto je posuzován význam metod iPFT pro běžnou klinickou praxi. Nově je též navržen jednoduchý nástroj pro hodnocení funkce periferních chemoreceptorů využívající analýzu ventilační odpovědi na hyperoxii. V závěrečné části je pak na podskupině pacientů studován vzájemný vztah remodelace dýchacích cest a poruchy funkce plic.

Na základě výsledků měření a pozorování shrnutých v předkládané dizertační práci formuluji následující odpovědi na hypotézy uvedené v úvodu praktické části práce:

- Metody iPFT a EBB jsou vysoce bezpečné i v nejnižších věkových kategoriích (pod 2 roky života).
- Proveditelnost jednotlivých metod iPFT se v klinické praxi pohybuje mezi 70 – 80 %, zatímco proveditelnost EBB dosahuje zhruba 50 %, tyto hodnoty jsou mírně nižší než ty udávané v rámci čistě výzkumných projektů.
- Jednotlivé metody iPFT jsou navzájem komplementární, tzn. je vhodná jejich kombinace, zvláště smysluplné se jeví spojení MBW – bodyplety smografie – rychlá torakoabdominální komprese.
- U pacientů s neutrofilním chronickým zánětem (CF a PCD) byla nalezena těsná a jednoznačně rostoucí závislost mezi nehomogenitou ventilace plic (časná porucha jejich funkce) a šířkou bazální membrány (známka remodelace dýchacích cest). Naopak u pacientů s eozinofilním zánětem (AB) a kontrol takováto závislost nalezena nebyla.
- Vzájemný vztah mezi poruchou funkce plic a remodelací stěny dýchacích cest tedy neplatí univerzálně, ale jen v rámci skupin pacientů definovaných na základě jejich patogeneze (typ zánětu).

- Metody iPFT jsou schopny rozlišit mezi podskupinami pacientů s CF či opakovanými obstrukčními epizodami definovanými na základě klinických charakteristik (např. klinický index rizika pro astma, u CF pak věk, mikrobiální kolonizace, počet exacerbací), to nepřímo dokládá jejich klinickou relevanci.
- Ventilační odpověď pacientů s CF na hyperoxii je oproti dětem s opakovanými obstrukčními epizodami opožděná a má tendenci perzistovat i v pozdějším věku, přesné příčiny této kvantitativní odlišnosti nebylo možno na získaných datech ozřejmit.

## 8. Závěr

Chronická respirační onemocnění dýchacího traktu jako jsou asthma bronchiale, cystická fibróza, primární ciliární dyskineze a další představují v současné době významný zdroj morbidity dětských pacientů a jednu z hlavních příčin jejich dispenzarizace. Ačkoliv byl v oblasti jejich diagnostiky a léčby učiněn velký pokrok, v nejnižších věkových kategoriích se stále potýkáme s omezenými možnostmi včasné detekce funkčních i morfologických deficitů. Vzhledem ke skutečnosti, že právě časné a cílené zahájení terapeutických intervencí je zcela klíčové pro prognózu pacienta, mohou tyto metody znamenat podstatný pokrok v péči o děti s chronickým respiračním onemocněním.

V nedávné době bylo významným způsobem rozšířeno spektrum funkčních a morfologických metod využitelných u malých dětí ve věku do 2 let života. Tyto sofistikované metody se navzájem liší svojí proveditelností, zátěží pro pacienta (invazivitou) i diagnostickou efektivitou (sensitivitou a specificitou). Jejich uplatnění při výzkumných aktivitách je dobře dokumentováno, naopak využití v klinické praxi zatím není příliš rozsáhlé. Hlavní udávanou limitací je jejich technická náročnost a nejasný klinický význam. V předkládané dizertační práci jsem si kladl za cíl alespoň dílčím způsobem přispět k ozřejmění jejich významu pro běžnou klinickou praxi. Jsem přesvědčen, že se získanými výsledky podařilo demonstrovat jejich bezpečnost, proveditelnost a potenciál pro zpřesnění diagnostického procesu. Věřím, že tyto výsledky mohou pomoci ke zkvalitnění péče o malé děti s chronickým respiračním onemocněním.

## 9. Souhrn

Úvod: V současné době je k dispozici řada metod plicní funkční diagnostiky nespolupracujících dětí (iPFT) a morfologického hodnocení mikroskopických změn ve vzorcích endobronchiálních biopsií (EBB). V rámci výzkumu umožňují detekovat časné patofyziologické změny dýchání již u nejmenších dětí s chronickým respiračním onemocněním, resp. v riziku jeho vzniku. Jejich klinické využití však v této věkové kategorii není dosud plně akceptováno. Cílem předkládané práce je zhodnotit bezpečnost, proveditelnost a klinický význam těchto metod ve věkové kategorii do 2 let. Ve vybraných skupinách pacientů je též hodnocena funkce periferních chemoreceptorů a dále vzájemný vztah morfologických a funkčních změn dýchacího traktu.

Metodika: Studijní soubor tvoří 55 dětí s cystickou fibrózou (CF), 35 s opakovanými obstrukčními epizodami (AB), 9 s vrozenou brániční kýlou, 7 s intersticiálním plicním onemocněním (chILD) a 3 s primární ciliární dyskinezi (PCD). U všech pacientů bylo provedeno vyšetření iPFT a zaznamenány relevantní anamnestické údaje. CF skupina byla podle věku rozdělena na CF<sub>malí</sub> (do 6 měsíců věku) a CF<sub>velcí</sub> (nad 6 měsíců). Ve skupině AB byla na základě klinického indexu rizika (API) definována nízcí (API-) a vysoce (API+) riziková podskupina. U 32 donošených pacientů z CF skupiny a 10 z API- s nekomplikovanou poporodní adaptací byla hodnocena ventilační odpověď na hyperoxii. U 19 pacientů byl při klinicky indikované bronchoskopii odebrán vzorek EBB a tekutiny bronchoalveolární laváže (BALF). Hodnoceny byly šířka bazální membrány, celularita lamina propria a diferenciální rozpočet buněk BALF. Kontrolní vzorky EBB byly získány z archivu Ústavu histologie a embryologie 2.LF UK. Během všech vyšetření byl evidován výskyt nežádoucích příhod.

Výsledky: Úspěšnost sedace pro vyšetření iPFT byla 87,2 %, v případě vlastního měření pak 66,3 až 89,5 % v závislosti na konkrétní metodě. Výskyt nežádoucích epizod během iPFT byl méně než 5 %, jednalo se pouze o případy desaturace zřejmě na podkladě přechodné obstrukce horních cest dýchacích. Výtěžnost EBB u dětí pod 2 roky života byla 57,9 %, hodnotitelná byla především šířka bazální membrány a celularita lamina propria mucosae. Jako komplikace EBB bylo zaznamenáno pouze mírné spontánně ustávající povrchové slizniční krvácení. Ekvivalentní funkční parametry získané různými metodami iPFT nebyly zaměnitelné. Očišťovací index plic z dusíkového washoutu (LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub>) byl v průměru o 1,48 jednotky vyšší než LCI<sub>2,5SF<sub>6</sub></sub>. Pro funkční reziduální kapacitu měřenou bodyplety-smograficky

( $FRC_{\text{box}}$ ), dusíkovým ( $FRC_{N_2}$ ) a hexafluoridovým ( $FRC_{SF_6}$ ) washoutem platil následující vztah:  $FRC_{\text{box}} \approx FRC_{N_2} > FRC_{SF_6}$ . Porucha funkce plic byla nalezena u 71,4 % dětí ze skupiny AB, v podskupině API+ byl signifikantně vyšší výskyt nehomogenity ventilace plic (LCI) a obstrukce periferních dýchacích cest ( $V'_{\text{maxFRC}}$ ). Specifická parametrů  $LCI_{2,5N_2}$  pro pozitivitu API významně převyšovala specifitu parametru  $V'_{\text{maxFRC}}$ , jejich senzitivita byla obdobná. U pacientů s CF byla porucha funkce plic nalezena v 63,9 %. Pacienti ze skupiny  $CF_{\text{velcí}}$  měli signifikantně horší funkci plic než  $CF_{\text{malí}}$ . Výsledky iPFT měly v CF skupině signifikantní vztah k vybraným charakteristikám klinického průběhu onemocnění (např. počet exacerbací, mikrobiální kolonizace). Ventilační odpověď na hyperoxii se kvantitativně lišila mezi CF a API- pacienty – u dětí s CF byla opožděná a hlubší. Bazální membrána u 11 pacientů ze skupiny CF, PCD a AB byla téměř dvojnásobně širší než v kontrolní skupině. U pacientů s neutrofilním zánětem (CF+PCD) byla nalezena těsná a rostoucí závislost nehomogenity ventilace na šířce bazální membrány. V kontrolní a AB skupině takový vztah nalezen nebyl.

Závěr: Vyšetření iPFT a EBB jsou ve skupině dětí ve věku do 2 let bezpečná. Jejich proveditelnost v klinické praxi je lehce nižší než ve výzkumu. Jednotlivé metody iPFT jsou vzájemně nezaměnitelné a je vhodná jejich kombinace. U CF a AB pacientů existuje vztah mezi parametry iPFT a vybranými klinickými charakteristikami průběhu onemocnění. Funkce periferních chemoreceptorů se kvantitativně liší mezi CF a API- pacienty. U CF a PCD pacientů je těsný a rostoucí vztah mezi šířkou bazální membrány a nehomogenitou ventilace.

**Klíčová slova:** funkční vyšetření plic u nespolupracujících dětí, test vícedechového vyplavování inertního plynu z plic, bodypletysmografie, rychlá torakoabdominální komprese, endobronchiální biopsie, remodelace dýchacích cest, bazální membrána, ventilační odpověď na hyperoxii, asthma bronchiale, cystická fibróza, chronické respirační onemocnění

## Abstract

**Introduction:** Currently, there are different methods for infant pulmonary function testing (iPFT) and morphological assessment of microscopic changes in endobronchial biopsy samples (EBB). In research setting, they allow detection of early pathophysiological changes of breathing in small children with chronic respiratory disease, respectively in risk of its development. Their clinical significance, however, is not fully acknowledged. The aim of this thesis is to evaluate the safety, feasibility and clinical significance of iPFT and EBB in infants younger than 2 years of age. In addition, the relationship between functional and morphological changes of respiratory tract and the function of peripheral chemoreceptors was studied in selected patients' subgroups.

**Methods:** Fifty-five infants with cystic fibrosis (CF), 35 physician-confirmed recurrent wheezers (AB), 9 infants with congenital diaphragmatic hernia, 7 with interstitial lung disease (chILD) and 3 with primary ciliary dyskinesia (PCD) were enrolled. All infants underwent iPFT and relevant clinical history data were recorded. Based on patients' age, CF group was divided into CF<sub>malí</sub> (< 6 months) and CF<sub>velcí</sub> (> 6 months) subgroup. AB group was divided into API+ and API- subgroup based on the positivity of Asthma Predictive Index (API). Ventilatory response to hyperoxia was assessed in 32 full-term CF infants and 10 API-wheezers, all with uncomplicated early postnatal period. In 19 infants clinically indicated bronchoscopy was performed and EBB and bronchoalveolar lavage (BAL) samples were taken for research purposes. Reticular basement membrane (RBM) thickness and cellularity of lamina propria was estimated. Differential cell count was assessed in BAL fluid. Control EBB samples were obtained from archive of the Department of Histology and Embryology, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University. Adverse events during iPFT and EBB were carefully recorded during all measurements.

**Results:** The success rate of sedation for iPFT reached 87.2%, the feasibility of the respective methods ranged between 66.3 and 89.5%. The incidence of adverse events was below 5%, only episodes of haemoglobin desaturation occurred, they were probably due to temporary obstruction of upper airways. The feasibility of EBB in children under 2 years was 57.9%, sample size allowed assessment of RBM thickness and cellularity of lamina propria in all cases. Brief mucosal bleeding was the only adverse event observed after EBB. The corresponding functional parameters derived from different iPFT methods were not interchangeable. Lung clearance index from nitrogen washout (LCI<sub>2,5N<sub>2</sub></sub>) was in average 1,48

unit higher than  $LCI_{2,5SF_6}$ . For functional residual capacity obtained by bodyplethysmography ( $FRC_{box}$ ), nitrogen ( $FRC_{N_2}$ ) and sulphurhexafluoride ( $FRC_{SF_6}$ ) washout following relation was found:  $FRC_{box} \approx FRC_{N_2} > FRC_{SF_6}$ . Lung function impairment of any art was found in 71.4% wheezers. In API+ subgroup, increased ventilation inhomogeneity ( $LCI_{2,5N_2}$ ) and peripheral airway obstruction ( $V'_{max}FRC$ ) was significantly more frequent than in API- subgroup. The specificity of  $LCI_{2,5N_2}$  for API positivity was significantly higher than that of  $V'_{max}FRC$ , sensitivity of both parameters was similar. In CF infants, lung function impairment of any art was found in 63.9%. Patients in  $CF_{velci}$  subgroup had more severe lung function impairment than patients in  $CF_{mali}$  subgroup. There was significant correlation between some of iPFT parameters and selected clinical characteristics (number of severe exacerbations, microbial colonization, etc.) in CF infants. Ventilatory response to hyperoxia in CF infants was delayed and deeper than in API- subgroup. RBM in 11 CF, PCD and AB patients was nearly twice thicker than in controls. In patients with neutrophilic airway inflammation (CF+PCD) close and rising correlation between  $LCI_{2,5N_2}$  and RBM was found. In controls and wheezers, there was no such correlation.

Conclusions: Infant pulmonary function testing and EBB are safe even in infants bellow 2 years of age. The feasibility of these methods in clinical routine is slightly lower than in a research setting. The respective iPFT methods are not interchangeable and their combination may be of clinical relevance. In CF and AB patients there exist a relation between iPFT parameters and selected clinical characteristics. Peripheral chemoreceptor function is quantitatively different between CF and API- infants. In CF and PCD, there is clear correlation between  $LCI_{2,5N_2}$  and RBM thickness.

Keywords: infant pulmonary function testing, inert gas multiple breath washout test, bodyplethysmography, tidal volume rapid thoracoabdominal compression, endobronchial biopsy, airway remodelling, reticular basement membrane, hyperoxia ventilatory response, bronchial asthma, cystic fibrosis, chronic respiratory diseases.

## 10. Literatura

- [1] Hello Ahlgren HG, Benedetti A, Landry JS, Bernier J, Matouk E, Radzioch D, Lands LC, Rousseau S, Nguyen D. Clinical outcomes associated with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in adult cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med*. 2015 Jun 21;15:67.
- [2] Altman, D. G., Bland, J. M. Measurement in medicine: The analysis of method comparison studies. *The Statistician*. 1983, 32(3), 307–17.
- [3] American Association for Respiratory Care clinical practice guideline. Infant/toddler pulmonary function tests. *Respir Care*. 1995 Jul;40(7):761-8, update 2008.
- [4] Aurora P, Bush A, Gustafsson P, Oliver C, Wallis C, Price J, Stroobant J, Carr S, Stocks J; London Cystic Fibrosis Collaboration.. Multiple-breath washout as a marker of lung disease in preschool children with cystic fibrosis *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Feb 1;171(3):249-56.
- [5] Baldwin DN, Pillow JJ, Stocks J, Frey U. Lung-function tests in neonates and infants with chronic lung disease: tidal breathing and respiratory control. *Pediatr Pulmonol*. 2006 May;41(5):391-419.
- [6] Bates JH, Schmalisch G, Filbrun D, Stocks J. Tidal breath analysis for infant pulmonary function testing. ERS/ATS Task Force on Standards for Infant Respiratory Function Testing. European Respiratory Society/American Thoracic Society. *Eur Respir J*. 2000 Dec;16(6):1180-92.
- [7] Bates ML, Pillers DA, Palta M, Farrell ET, Eldridge MW. Ventilatory control in infants, children, and adults with bronchopulmonary dysplasia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013 Nov 1;189(2):329-37.
- [8] Beardsmore CS, Thompson JR, Williams A, McArdle EK, Gregory GA, Weaver LT, Simpson H. Pulmonary function in infants with cystic fibrosis: the effect of antibiotic treatment. *Arch Dis Child*. 1994 Aug;71(2):133-7.
- [9] Becklake MR. A New Index of the Intrapulmonary Mixture of Inspired Air. *Thorax* 1952; 7:111.
- [10] Bedrossian CW, Greenberg SD, Singer DB, Hansen JJ, Rosenberg HS. The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum Pathol*. 1976 Mar;7(2):195-204.



- [11] Belessis Y, Dixon B, Hawkins G, Pereira J, Peat J, MacDonald R, Field P, Numa A, Morton J, Lui K, Jaffe A. Early cystic fibrosis lung disease detected by bronchoalveolar lavage and lung clearance index. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(8):862.
- [12] Berankova K, Uhlik J, Honkova L, Pohunek P. Structural changes in the bronchial mucosa of young children at risk of developing asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014 Mar;25(2):136-42.
- [13] Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, Arets HGM, Marck-van der Wilt REP, Dijkema JS, Vanderschuren MM, Houwen RHJ, Heijerman HGM, van de Graaf EA, Elias SG, Majoor CJ, Koppelman GH, Roukema J, Bakker M, Janssens HM, van der Meer R, Vries RGJ, Clevers HC, de Jonge HR, Beekman JM, van der Ent CK. Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis. *Cell Rep*. 2019 Feb 12;26(7):1701-1708.e3.
- [14] Bhalla M, Turcios N, Aponte V, Jenkins M, Leitman BS, McCauley DI, Naidich DP. Cystic fibrosis: scoring system with thin section CT. *Radiology*. 1991;179:783–8.
- [15] Blair E, Hickam JB. The effect of change in body position on lung volume and intrapulmonary gas mixing in normal subjects. *J Clin Invest*. 1955 Mar;34(3):383-9.
- [16] Bonestroo HJ, de Winter-de Groot KM, van der Ent CK, Arets HG. Upper and lower airway cultures in children with cystic fibrosis: do not neglect the upper airways. *J Cyst Fibros*. 2010 Mar;9(2):130-4.
- [17] Boon M, Vermeulen FL, Gysemans W, Proesmans M, Jorissen M, De Boeck K. Lung structure-function correlation in patients with primary ciliary dyskinesia. *Thorax*. 2015 Apr;70(4):339-45.
- [18] Borrego LM, Stocks J, Leiria-Pinto P, Peralta I, Romeira AM, Neuparth N, Rosado-Pinto JE, Hoo AF. Lung function and clinical risk factors for asthma in infants and young children with recurrent wheeze. *Thorax*. 2009 Mar;64(3):203-9.
- [19] Bouferrache B, Filtchev S, Leke A, Freville M, Gallego J, Gaultier C. Comparison of the hyperoxic test and the alternate breath test in infants. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan 15;165(2):206-10.

- [20] Bouferrache B, Filtchev S, Leke A, Marbaix-Li Q, Freville M, Gaultier C. The hyperoxic test in infants reinvestigated. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):160-5.
- [21] Brasfield D, Hicks G, Soong S, Tiller RE. The chest roentgenogram in cystic fibrosis: a new scoring system. *Pediatrics*. 1979 Jan;63(1):24-9.
- [22] Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990 Nov;3(5):507-11.
- [23] Brody AS, Kosorok MR, Li Z, Broderick LS, Foster JL, Laxova A, Bandla H, Farrell PM. Reproducibility of a scoring system for computed tomography scanning in cystic fibrosis. *J Thorac Imaging*. 2006 Mar;21(1):14-21.
- [24] Brown DE, Pittman JE, Leigh MW, Fordham L, Davis SD. Early lung disease in young children with primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*. 2008 May;43(5):514-6.
- [25] Bush A, Pohunek P. Brush biopsy and mucosal biopsy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Aug;162(2 Pt 2):S18-22.
- [26] Calder AD, Bush A, Brody AS, Owens CM. Scoring of chest CT in children with cystic fibrosis: state of the art. *Pediatr Radiol*. 2014 Dec;44(12):1496-506.
- [27] Cardot V, Chardon K, Tourneux P, Micallef S, Stéphan E, Léké A, Bach V, Libert JP, Telliez F. Ventilatory response to a hyperoxic test is related to the frequency of short apneic episodes in late preterm neonates. *Pediatr Res*. 2007 Nov;62(5):591-6.
- [28] Carroll MS, Patwari PP, Kenny AS, Brogadir CD, Stewart TM, Weese-Mayer DE. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation (ROHHAD): Response to ventilatory challenges. *Pediatr Pulmonol*. 2015 Dec;50(12):1336-45.
- [29] Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Barben J, Flume PA, Hodková P, Kashirskaya N, Kirszenbaum MN, Madge S, Oxley H, Plant B, Schwarzenberg SJ, Smyth AR, Taccetti G, Wagner TOF, Wolfe SP, Drevinek P. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros*. 2018 Mar;17(2):153-178.
- [30] Castile R, Filbrun D, Flucke R, Franklin W, McCoy K. Adult-type pulmonary function tests in infants without respiratory disease. *Pediatr Pulmonol*. 2000 Sep;30(3):215-27.

- [31] Castile RG, Iram D, McCoy KS. Gas trapping in normal infants and in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2004 May;37(5):461-9.
- [32] Castro-Rodríguez, J.A., Holberg, C.J., Wright, A.L., Martinez, F.D. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1403–06.
- [33] Cogswell JJ, Hull D, Milner AD, Norman AP, Taylor B. Lung function in childhood. 2. Thoracic gas volumes and helium functional residual capacity measurements in healthy children. *Br J Dis Chest*. 1975 Apr;69(2):118–24.
- [34] Colom AJ, Maffey A, Garcia Bournissen F, Teper A. Pulmonary function of a paediatric cohort of patients with postinfectious bronchiolitis obliterans. A long term follow-up. *Thorax*. 2015 Feb;70(2):169-74.
- [35] Cross KW, Warner P. The effect of inhalation of high and low oxygen concentrations on the respiration of the newborn infant. *J Physiol* 1951 Jul;114(3):283-95.
- [36] Cutz E, Levison H, Cooper DM. Ultrastructure of airways in children with asthma. *Histopathology*. 1978 Nov;2(6):407-21.
- [37] Davies G, Stocks J, Thia LP, Hoo AF, Bush A, Aurora P, Brennan L, Lee S, Lum S, Cottam P, Miles J, Chudleigh J, Kirkby J, Balfour-Lynn IM, Carr SB, Wallis C, Wyatt H, Wade A; London Cystic Fibrosis Collaboration (LCFC). Pulmonary function deficits in newborn screened infants with cystic fibrosis managed with standard UK care are mild and transient. *Eur Respir J*. 2017 Nov 9;50(5):1700326.
- [38] Davis SD, Rosenfeld M, Kerby GS, Brumback L, Kloster MH, Acton JD, Colin AA, Conrad CK, Hart MA, Hiatt PW, Mogayzel PJ, Johnson RC, Wilcox SL, Castile RG. Multicenter evaluation of infant lung function tests as cystic fibrosis clinical trial endpoints. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Dec 1;182(11):1387-97.
- [39] De Blic J, Marchac V, Scheinmann P. Complications of flexible bronchoscopy in children: prospective study of 1,328 procedures. *Eur Respir J*. 2002 Nov;20(5):1271-6.
- [40] De Blic J, Midulla F, Barbato A, Clement A, Dab I, Eber E, Green C, Grigg J, Kotecha S, Kurland G, Pohunek P, Ratjen F, Rossi G. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. *Eur Respir J*. 2000 Jan;15(1):217-31.
- [41] De Blic J, Scheinmann P. The use of imaging techniques for assessing severe childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):808-10.

- [42] De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016;4(8):662-74.
- [43] De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, Vermeulen F, Sheppard DN, Cuppens H, Hug M, Melotti P, Middleton PG, Wilschanski M; ECFS Diagnostic Network Working Group; EuroCareCF WP3 Group on CF diagnosis. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S53-66.
- [44] De Boer K, Vandemheen KL, Tullis E, Doucette S, Fergusson D, Freitag A, Paterson N, Jackson M, Loughheed MD, Kumar V, Aaron SD. Exacerbation frequency and clinical outcomes in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 2011 Aug;66(8):680-5.
- [45] Dejours P. Chemoreflexes in breathing. *Physiol Rev* 1962 Jul;42:335-58.
- [46] Dolfin T, Duffty P, Wilkes D, England S, Bryan H. Effects of a face mask and pneumotachograph on breathing in sleeping infants. *Am Rev Respir Dis.* 1983 Dec;128(6):977-9.
- [47] Doulgeraki A, Petrocheilou A, Petrocheilou G, Chrousos G, Doudounakis SE, Kaditis AG. Body composition and lung function in children with cystic fibrosis and meconium ileus. *Eur J Pediatr.* 2017 Jun;176(6):737-43.
- [48] DuBois AB, Botelho SY, Bedell GN, Marshall R, Comroe JH Jr. A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume; a comparison with a nitrogen wash-out method for measuring functional residual capacity. *J Clin Invest.* 1956 Mar;35(3):322-6.
- [49] Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax.* 1969 Mar;24(2):176-9.
- [50] Durieu I, Peyrol S, Gindre D, Bellon G, Durand DV, Pacheco Y. Subepithelial fibrosis and degradation of the bronchial extracellular matrix in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Aug;158(2):580-8.
- [51] Eber E, Steinbrugger B, Modl M, Weinhandl E, Zach MS. Lung volume measurements in wheezy infants: comparison of plethysmography and gas dilution. *Eur Respir J.* 1994 Nov;7(11):1988-94.
- [52] Ehsan Z, Montgomery GS, Tiller C, Kisling J, Chang DV, Tepper RS. An infant with pulmonary interstitial glycogenosis: clinical improvement is associated with

- improvement in the pulmonary diffusion capacity. *Pediatr Pulmonol.* 2014 Mar;49(3):E17-20.
- [53] Eibel R, Herzog P, Dietrich O, Rieger CT, Ostermann H, Reiser MF, Schoenberg SO. Pulmonary abnormalities in immunocompromised patients: comparative detection with parallel acquisition MR imaging and thin-section helical CT. *Radiology.* 2006 Dec;241(3):880-91.
- [54] Evans AK, Fitzgerald DA, McKay KO. The impact of meconium ileus on the clinical course of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2001 Nov;18(5):784-9.
- [55] Gappa M, Colin AA, Goetz I, Stocks J; ERS/ATS Task Force on Standards for Infant Respiratory Function Testing. European Respiratory Society/American Thoracic Society. Passive respiratory mechanics: the occlusion techniques. *Eur Respir J.* 2001 Jan;17(1):141-8.
- [56] Gappa M, Fletcher ME, Dezateux CA, Stocks J. Comparison of nitrogen wash-out and plethysmographic measurements of lung volume in healthy infants. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1496–1501.
- [57] Gappa M, Pillow JJ, Allen J, Mayer O, Stocks J. Lung function tests in neonates and infants with chronic lung disease: lung and chest-wall mechanics. *Pediatr Pulmonol.* 2006 Apr;41(4):291-317.
- [58] Gappa M, Ranganathan SC, Stocks J. Lung function testing in infants with cystic fibrosis: lessons from the past and future directions. *Pediatr Pulmonol.* 2001 Sep;32(3):228-45.
- [59] Garvey JF, Taylor CT, McNicholas WT. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. *Eur Respir J.* 2009 May;33(5):1195-205.
- [60] Godfrey S, Bar-Yishay E, Avital A, Springer C: Peterson-Carmichael SL, Rosenfeld M, Ascher SB, Hornik CP, Arets HG, Davis SD, Hall GL: Survey of clinical infant lung function testing practices, *Pediatr Pulmonol.* 2014 Feb;49(2):126-31.
- [61] Godfrey S, Springer C, Bar-Yishay E. Evaluating the lung function of infants. *Isr Med Assoc J.* 2009 Aug;11(8):492-7.
- [62] Guillerman RP. Imaging of Childhood Interstitial Lung Disease. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol.* 2010 Mar;23(1):43-68.

- [63] Gustafsson PM, Aurora P, Lindblad A. Evaluation of ventilation maldistribution as an early indicator of lung disease in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2003 Dec;22(6):972-9.
- [64] Gustafsson PM, Bengtsson L, Lindblad A, Robinson PD. The effect of inert gas choice on multiple breath washout in healthy infants: differences in lung function outcomes and breathing pattern. *J Appl Physiol* (1985). 2017 Dec 1;123(6):1545-1554.
- [65] Gustafsson PM, De Jong PA, Tiddens HA, Lindblad A. Multiple-breath inert gas washout and spirometry versus structural lung disease in cystic fibrosis. *Thorax*. 2008 Feb;63(2):129-34.
- [66] Gustafsson PM. Peripheral Airway Involvement in CF and Asthma Compared by Inert Gas Washout. *Pediatr Pulmonol* 2007 Feb;42(2):168-76.
- [67] Ha SY, Helms P, Fletcher M, Broadbent V, Pritchard J. Lung involvement in Langerhans' cell histiocytosis: prevalence, clinical features, and outcome. *Pediatrics*. 1992 Mar;89(3):466-9.
- [68] Håland G, Carlsen KC, Sandvik L, Devulapalli CS, Munthe-Kaas MC, Pettersen M, Carlsen KH; ORAACLE: Reduced lung function at birth and the risk of asthma at 10 years of age, *N Engl J Med*. 2006 Oct 19;355(16):1682-9.
- [69] Hanrahan JP, Brown RW, Carey VJ, Castile RG, Speizer FE, Tager IB. Passive respiratory mechanics in healthy infants. Effects of growth, gender, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):670-80.
- [70] Hansell DM. Bankier AA. MacMahon H. McLoud TC. Müller NL. Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology*. 2008 Mar;246(3):697–722.
- [71] Harris WT, Muhlebach MS, Oster RA, Knowles MR, Noah TL. Transforming growth factor-beta(1) in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009 Nov;44(11):1057-64.
- [72] Harvey SC. Hypnotics and sedatives. In: Goodman LS, Gilman A, Rall TW, Murad F, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. Macmillan Co. London. 1985; 339-71.
- [73] Helbich TH, Heinz-Peer G, Eichler I, Wunderbaldinger P, Götz M, Wojnarowski C, Brasch RC, Herold CJ. Cystic fibrosis: CT assessment of lung involvement in children and adults. *Radiology*. 1999 Nov;213(2):537-44.

- [74] Hertzberg T, Lagercrantz H. Postnatal sensitivity of the peripheral chemoreceptors in newborn infants. *Arch Dis Child*. 1987 Dec;62(12):1238–41.
- [75] Hevroni A, Goldman A, Springer C. Infant pulmonary function testing in chronic pneumonitis of infancy due to surfactant protein C mutation. *Pediatr Pulmonol*. 2015 Jun;50(6):E17-23.
- [76] Hiatt P, Eigen H, Yu P, Tepper RS. Bronchodilator responsiveness in infants and young children with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Jan;137(1):119-22.
- [77] Hilliard TN, Regamey N, Shute JK, Nicholson AG, Alton EW, Bush A, Davies JC. Airway remodelling in children with cystic fibrosis. *Thorax*. 2007 Dec;62(12):1074-80.
- [78] Hoňková L, Uhlík J, Beránková K, Svobodová T, Pohunek P. Epithelial basement membrane thickening is related to TGF-Beta 1 expression in children with chronic respiratory diseases. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014 Oct;25(6):593-9.
- [79] Hoo AF, Dezateux C, Hanrahan JP, Cole TJ, Tepper RS, Stocks J. Sex-specific prediction equations for Vmax(FRC) in infancy: a multicenter collaborative study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Apr 15;165(8):1084-92.
- [80] Hoo AF, Thia LP, Nguyen TT, Bush A, Chudleigh J, Lum S, Ahmed D, Balfour Lynn I, Carr SB, Chavasse RJ, Costeloe KL, Price J, Shankar A, Wallis C, Wyatt HA, Wade A, Stocks J; London Cystic Fibrosis Collaboration. Lung function is abnormal in 3-month-old infants with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening. *Thorax*. 2012 Oct;67(10):874-81.
- [81] Horáček J, Koucký V, Hladík M. Novel approach to computerized breath detection in lung function diagnostics. *Comput Biol Med*. 2018 Oct 1;101:1-6.
- [82] Horsley AR, Davies JC, Gray RD, Macleod KA, Donovan J, Aziz ZA, Bell NJ, Rainer M, Mt-Isa S, Voase N, Dewar MH, Saunders C, Gibson JS, Parra-Leiton J, Larsen MD, Jeswiet S, Soussi S, Bakar Y, Meister MG, Tyler P, Doherty A, Hansell DM, Ashby D, Hyde SC, Gill DR, Greening AP, Porteous DJ, Innes JA, Boyd AC, Griesenbach U, Cunningham S, Alton EW. Changes in physiological, functional and structural markers of cystic fibrosis lung disease with treatment of a pulmonary exacerbation. *Thorax*. 2013 Jun;68(6):532-9.
- [83] Houston JC, De Navasquez S, Trounce JR. A Clinical and Pathological Study of Fatal Cases of Status Asthmaticus. *Thorax*. 1953 Sep;8(3):207-13.

- [84] Hulskamp G, Hoo AF, Ljungberg H, Lum S, Pillow JJ, Stocks J. Progressive decline in plethysmographic lung volumes in infants: physiology or technology? *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 15;168(8):1003–9.
- [85] Hulskamp G, Pillow JJ, Dinger J, Stocks J. Lung function tests in neonates and infants with chronic lung disease of infancy: functional residual capacity. *Pediatr Pulmonol*. 2006 Jan;41(1):1–22.
- [86] Hunt CE, Hazinski TA, Gora P. Experimental effects of chloral hydrate on ventilatory response to hypoxia and hypercarbia. *Pediatr Res*. 1982 Jan;16(1):79-81.
- [87] Chang AB, Bush A, Grimwood K. Bronchiectasis in children: diagnosis and treatment. *Lancet*. 2018 Sep 8;392(10150):866-79.
- [88] Irving SJ, Ives A, Davies G, Donovan J, Edey AJ, Gill SS, Nair A, Saunders C, Wijesekera NT, Alton EW, Hansell D, Hogg C, Davies JC, Bush A. Lung clearance index and high-resolution computed tomography scores in primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Sep 1;188(5):545-9.
- [89] Jackson EA, Rabbette PS, Dezateux C, Hatch DJ, Stocks J. The effect of triclofos sodium sedation on respiratory rate, oxygen saturation, and heart rate in infants and young children. *Pediatr Pulmonol*. 1991;10(1):40-5.
- [90] Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Dec;140(6):1745-53.
- [91] Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S28-38.
- [92] Jensen R, Green K, Gustafsson P, Latzin P, Pittman J, Ratjen F, Robinson P, Singer F, Stanojevic S, Yammine S. Standard operating procedure: multiple breath nitrogen washout. *EcoMedics AG, Duernten, Switzerland*. 2013 Nov 11.
- [93] Jensen R, Stanojevic S, Gibney K, Salazar JG, Gustafsson P, Subbarao P, Ratjen F. Multiple breath nitrogen washout: a feasible alternative to mass spectrometry. *PLoS One*. 2013;8(2):e56868.
- [94] Johnson JA, Bush A, Buchdahl R. Does presenting with meconium ileus affect the prognosis of children with cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol*. 2010 Oct;45(10):951-8.
- [95] Jones M, Castile R, Davis S, Kisling J, Filbrun D, Flucke R, Goldstein A, Emsley C, Ambrosius W, Tepper RS. Forced expiratory flows and volumes in infants.



- Normative data and lung growth. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Feb;161(2 Pt 1):353–9.
- [96] Kapur N, Masel JP, Watson D, Masters IB, Chang AB. Bronchoarterial ratio on high-resolution CT scan of the chest in children without pulmonary pathology: need to redefine bronchial dilatation. *Chest*. 2011 Jun;139(6):1445-50.
- [97] Katier N, Uiterwaal CS, de Jong BM, Verheij TJ, van der Ent CK. Passive respiratory mechanics measured during natural sleep in healthy term neonates and infants up to 8 weeks of life. *Pediatr Pulmonol* 2006 Nov;41(11):1058–1064.
- [98] Katz-Salamon M, Eriksson M, Jónsson B. Development of peripheral chemoreceptor function in infants with chronic lung disease and initially lacking hyperoxic response. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1996 Jul;75(1):F4-9.
- [99] Katz-Salamon M, Jonsson B, Lagercrantz H. Blunted peripheral chemoreceptor response to hyperoxia in a group of infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*. 1995 Aug;20(2):101-6.
- [100] Keklikian E, Sanchez-Solis M, Bonina AJ, Meneguzzi A, Pastor-Vivero MD, Mondejar-Lopez P, Garcia-Marcos L. Do risk factors for persistent asthma modify lung function in infants and young children with recurrent wheeze? *Pediatr Pulmonol*. 2010 Sep;45(9):914-8.
- [101] Kerby GS, Wagner BD, Popler J, Hay TC, Kopecky C, Wilcox SL, Quinones RR, Giller RH, Accurso FJ, Deterding RR. Abnormal infant pulmonary function in young children with neuroendocrine cell hyperplasia of infancy. *Pediatr Pulmonol*. 2013 Oct;48(10):1008-15.
- [102] Kerem E, Bentur L, England S, Reisman J, O'Broovich H, Bryan AC, Levison H. Sequential pulmonary function measurements during treatment of infantile chronic interstitial pneumonitis. *J Pediatr*. 1990 Jan;116(1):61-7.
- [103] Kerem E, Viviani L, Zolin A, MacNeill S, Hatziagorou E, Ellemunter H, Drevinek P, Gulmans V, Krivec U, Olesen H; ECFS Patient Registry Steering Group. Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *Eur Respir J*. 2014 Jan;43(1):125-33.
- [104] Kobzova J, Vignerova J, Blaha P, Krejcovsky L, Riedlova J, The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001, *Cent. Eur. J. Public Health*. 2004 Sep;12(3):126–30.

- [105] Koucký V, Pohunek P. Využití metody vícedechového vyplavování inertního plynu z plic ve funkční plicní diagnostice u dětí. *Stud. Pneumologica et Phthiseologica*. 2016;76(1):10-20.
- [106] Koucký V, Skalická V, Pohunek P. Nitrogen multiple breath washout test for infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2018 Aug 2;52(2):1800015.
- [107] Koucky V, Uhlik J, Pohunek P. The relation of matrix metalloproteinases 2 and 9 to reticular basement membrane thickening in chronic neutrophilic airway inflammation. *Pediatr. Pulmonol*. 2019 Jun;54(Suppl 1):S76.
- [108] Koucký V., Skalická V., Bartošová J., Doušová T., Vávrová V., Pohunek P. Funkce plic souboru českých kojenců a batolat s cystickou fibrózou. *Čes-slov Pediat* 2019; 74 (7): 392-400.
- [109] Koucky V., Uhlik J., Dousova T, Skalicka V, Pohunek P. How does the basement membrane change in patients with cystic fibrosis? *J Cyst Fibros*. 2018 Jun;17(Suppl 3):S91.
- [110] Koucký V, Uhlik J, Hoňková L, Koucký M, Doušová T, Pohunek P. Ventilation Inhomogeneity and Bronchial Basement Membrane Changes in Chronic Neutrophilic Airway Inflammation. *Chest*. 2019 Nov 9;S0012-3692(19)34188-1. [Epub ahead of print].
- [111] Koumbourlis AC, Wung JT, Stolar CJ. Lung function in infants after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2006 Oct;41(10):1716-21.
- [112] Kraemer R, Zehnder M, Meister B. Intrapulmonary gas distribution in children. *Respir Physiol* 1986 Aug;65(2): 127–37.
- [113] Lack EE: Carotid body hypertrophy in patients with cystic fibrosis and cyanotic congenital heart disease, *Hum Pathol*. 1977 Jan;8(1):39-51.
- [114] Laitinen LA, Laitinen A, Altraja A, Virtanen I, Kämpe M, Simonsson BG, Karlsson SE, Håkansson L, Venge P, Sillastu H. Bronchial biopsy findings in intermittent or "early" asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Nov;98(5 Pt 2):S3-6; discussion S33-40.
- [115] Lanteri CJ, Sly PD. Changes in respiratory mechanics with age. *J Appl Physiol* (1985). 1993 Jan;74(1):369-78.
- [116] Lees MH, Olsen GD, McGilliard KL, Newcomb JD, Sunderland CO. Chloral hydrate and the carbon dioxide chemoreceptor response: A study of puppies and infants. *Pediatrics*. 1982 Sep;70(3):447-50.

- [117] Lhotská L, Bláha P, Vignerová J, Roth Z, Prokopec M. Vth nation-wide anthropological survey 1991 in the Czech Republic comparison with 1981 data. *Cent Eur J Public Health*. 1994 Dec;2(2):95-9.
- [118] Li Z, Lai HJ, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Splaingard ML, Farrell PM. Longitudinal pulmonary status of cystic fibrosis children with meconium ileus. *Pediatr Pulmonol*. 2004 Oct;38(4):277-84.
- [119] Liou TG, Adler FR, Fitzsimmons SC, Cahill BC, Hibbs JR, Marshall BC. Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *Am J Epidemiol*. 2001 Feb 15;153(4):345-5.
- [120] Long FR, Williams RS, Castile RG. Structural airway abnormalities in infants and young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2004 Feb;144(2):154–61.
- [121] Loubières Y, Grenet D, Simon-Bouy B, Medioni J, Landais P, Férec C, Stern M. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest*. 2002 Jan;121(1):73-80.
- [122] Lu Z, Foong RE, Kowalik K, Moraes TJ, Boyce A, Dubeau A, Balkovec S, Gustafsson PM, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Lou W, Ratjen F, Sears M, Subbarao P. Ventilation inhomogeneity in infants with recurrent wheezing. *Thorax*. 2018 Oct;73(10):936-41.
- [123] Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, Dell S, Eber E, Escudier E, Hirst RA, Hogg C, Jorissen M, Latzin P, Legendre M, Leigh MW, Midulla F, Nielsen KG, Omran H, Papon JF, Pohunek P, Redfern B, Rigau D, Rindlisbacher B, Santamaria F, Shoemark A, Snijders D, Tonia T, Titieni A, Walker WT, Werner C, Bush A, Kuehni CE. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2017 Jan 4;49(1):1601090.
- [124] Lum S, Gustafsson P, Ljungberg H, Hülkamp G, Bush A, Carr SB, Castle R, Hoo AF, Price J, Ranganathan S, Stroobant J, Wade A, Wallis C, Wyatt H, Stocks J; London Cystic Fibrosis Collaboration. Early detection of cystic fibrosis lung disease: multiple-breath washout versus raised volume tests. *Thorax*. 2007 Apr;62(4):341-7.
- [125] Lum S, Hülkamp G, Merkus P, Baraldi E, Hofhuis W, Stocks J. Lung function tests in neonates and infants with chronic lung disease: forced expiratory maneuvers. *Pediatr Pulmonol*. 2006 Mar;41(3):199-214

- [126] Lum S, Stocks J, Stanojevic S, Wade A, Robinson P, Gustafsson P, Brown M, Aurora P, Subbarao P, Hoo AF, Sonnappa S. Age and height dependence of lung clearance index and functional residual capacity. *Eur Respir J*. 2013 Jun;41(6):1371-7.
- [127] MacFarlane PM, Ribeiro AP, Martin RJ: Carotid chemoreceptor development and neonatal apnea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013 Jan 1;185(1):170-6.
- [128] Macleod KA, Horsley AR, Bell NJ, Greening AP, Innes JA, Cunningham S. Ventilation heterogeneity in children with well controlled asthma with normal spirometry indicates residual airways disease, *Thorax*. 2009 Jan;64(1):33–7.
- [129] Mallol J, Sly PD. Effect of chloral hydrate on arterial oxygen saturation in wheezy infants. *Pediatr Pulmonol*. 1988;5(2):96-9.
- [130] Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants, *N Engl J Med*. 1988 Oct 27;319(17):1112-7.
- [131] Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med*. 1995 Jan 19;332(3):133-8.
- [132] Matecki S, Kent L, de Boeck K, Le Bourgeois M, Zielen S, Braggion C, Arets HG, Bradley J, Davis S, Sermet I, Reix P; respiratory function group of the European Cystic Fibrosis Society Clinical Trial Network. Is the raised volume rapid thoracic compression technique ready for use in clinical trials in infants with cystic fibrosis? *J Cyst Fibros*. 2016 Jan;15(1):10-20.
- [133] Midulla F, de Blic J, Barbato A, Bush A, Eber E, Kotecha S, Haxby E, Moretti C, Pohunek P, Ratjen F; ERS Task Force. Flexible endoscopy of paediatric airways. *Eur Respir J*. 2003 Oct;22(4):698-708.
- [134] Molina-Teran A, Hilliard TN, Saglani S, Haxby E, Scallan M, Bush A, Davies JC. Safety of endobronchial biopsy in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2006 Nov;41(11):1021-4.
- [135] Mortola JP, Frappell PB, Dotta A, Matsuoka T, Fox G, Weeks S, Mayer D. Ventilatory and metabolic responses to acute hyperoxia in newborns. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jul;146(1):11-5.
- [136] Mott LS, Park J, Murray CP, Gangell CL, de Klerk NH, Robinson PJ, Robertson CF, Ranganathan SC, Sly PD, Stick SM; AREST CF. Progression of early

- structural lung disease in young children with cystic fibrosis assessed using CT. *Thorax*. 2012 Jun;67(6):509-16.
- [137] Nakayama D, Motoyama EK, Mutich RL, Koumbourlis AC. Pulmonary function in newborns after repair of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol*. 1991;11(1):49-55.
- [138] Nguyen TT, Hoo AF, Lum S, Wade A, Thia LP, Stocks J. New reference equations to improve interpretation of infant lung function. *Pediatr Pulmonol*. 2013 Apr;48(4):370-80.
- [139] Nguyen TT, Thia LP, Hoo AF, Bush A, Aurora P, Wade A, Chudleigh J, Lum S, Stocks J; London Cystic Fibrosis Collaboration (LCFC). Evolution of lung function during the first year of life in newborn screened cystic fibrosis infants. *Thorax*. 2014 Oct;69(10):910-7.
- [140] Nielsen N, Nielsen JG, Horsley AR. Evaluation of the impact of alveolar nitrogen excretion on indices derived from multiple breath nitrogen washout. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73335.
- [141] Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, Grimwood K, Wainwright C. Early airway infection, inflammation, and lung function in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2002 Oct;87(4):306-11.
- [142] Owens CM, Aurora P, Stanojevic S, Bush A, Wade A, Oliver C, Calder A, Price J, Carr SB, Shankar A, Stocks J; London Cystic Fibrosis Collaboration. Lung Clearance Index and HRCT are complementary markers of lung abnormalities in young children with CF. *Thorax*. 2011 Jun;66(6):481-8.
- [143] Payne D, McKenzie SA, Stacey S, Misra D, Haxby E, Bush A. Safety and ethics of bronchoscopy and endobronchial biopsy in difficult asthma. *Arch Dis Child*. 2001 May;84(5):423-6.
- [144] Peterson-Carmichael SL, Rosenfeld M, Ascher SB, Hornik CP, Arets HG, Davis SD, Hall GL: Survey of clinical infant lung function testing practices, *Pediatr Pulmonol*. 2014 Feb;49(2):126-31.
- [145] Pillarisetti N, Williamson E, Linnane B, Skoric B, Robertson CF, Robinson P, Massie J, Hall GL, Sly P, Stick S, Ranganathan S; Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST CF). Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 1;184(1):75-81.

- [146] Pillow JJ, Frerichs I, Stocks J. Lung function tests in neonates and infants with chronic lung disease: global and regional ventilation inhomogeneity. *Pediatr Pulmonol.* 2006 Feb;41(2):105-21.
- [147] Pohunek P, Warner JO, Turzíkova J, Kudrman J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005 Feb;16(1):43-51.
- [148] Porzionato A, Macchi V, Stecco C, De Caro R. The carotid body in Sudden Infant Death Syndrome, *Respir Physiol Neurobiol.* 2013 Jan 1;185(1):194-201.
- [149] Puderbach M, Hintze C, Ley S, Eichinger M, Kauczor HU, Biederer J. MR imaging of the chest: a practical approach at 1.5T. *Eur J Radiol.* 2007 Dec;64(3):345-55.
- [150] Racette C, Lu Z, Kowalik K, Cheng O, Bendiak G, Amin R, Dubeau A, Jensen R, Balkovec S, Gustafsson P, Ratjen F, Subbarao P. Lung clearance index is elevated in young children with symptom-controlled asthma. *Health Sci Rep.* 2018 Jun 19;1(8):e58.
- [151] Ramsey KA, Foong RE, Grdosic J, Harper A, Skoric B, Clem C, Davis M, Turkovic L, Stick SM, Davis SD, Ranganathan SC, Hall GL; Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST CF). Multiple-Breath Washout Outcomes Are Sensitive to Inflammation and Infection in Children with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2017 Sep;14(9):1436-1442.
- [152] Ranganathan SC, Goetz I, Hoo AF, Lum S, Castle R, Stocks J; London Collaborative Cystic Fibrosis Group. Assessment of tidal breathing parameters in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2003 Nov;22(5):761-6.
- [153] Rasch, D, Teuscher, F, Guiard, V. How robust are tests for two independent samples? *Journal of Statistical Planning and Inference.* 2007,137:2706–20.
- [154] Regamey N, Hilliard TN, Saglani S, Zhu J, Scallan M, Balfour-Lynn IM, Rosenthal M, Jeffery PK, Alton EW, Bush A, Davies JC. Quality, size, and composition of pediatric endobronchial biopsies in cystic fibrosis. *Chest.* 2007 Jun;131(6):1710-7.
- [155] Regamey N, Ochs M, Hilliard TN, Mühlfeld C, Cornish N, Fleming L, Saglani S, Alton EW, Bush A, Jeffery PK, Davies JC. Increased airway smooth muscle mass in children with asthma, cystic fibrosis, and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Apr 15;177(8):837-43.

- [156] Rigatto H, Desai U, Leahy F, Kalapesi Z, Cates D. The effect of 2% CO<sub>2</sub>, 100% O<sub>2</sub>, theophylline and 15% O<sub>2</sub> on "inspiratory drive" and "effective" timing in preterm infants. *Early Hum Dev.* 1981 Feb;5(1):63-70.
- [157] Robinson PD, Goldman MD, Gustafsson PM. Inert Gas Washout: Theoretical Background and Clinical Utility in Respiratory Disease, *Respiration* 2009; 78(3):339–55.
- [158] Robinson PD, Latzin P, Verbanck S, Hall GL, Horsley A, Gappa M, Thamrin C, Arets HG, Aurora P, Fuchs SI, King GG, Lum S, Macleod K, Paiva M, Pillow JJ, Ranganathan S, Ratjen F, Singer F, Sonnappa S, Stocks J, Subbarao P, Thompson BR, Gustafsson PM. Consensus statement for inert gas washout measurement using multiple- and single breath tests. *Eur Respir J* 2013;41:507-22.
- [159] Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1989 Mar 11;1(8637):520-4.
- [160] Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, Castile R, Grimwood K, Hiatt P, McCoy K, McNamara S, Ramsey B, Wagener J. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1999 Nov;28(5):321-8.
- [161] Rosenfeld M, Allen J, Arets BH, Aurora P, Beydon N, Calogero C, Castile RG, Davis SD, Fuchs S, Gappa M, Gustaffson PM, Hall GL, Jones MH, Kirkby JC, Kraemer R, Lombardi E, Lum S, Mayer OH, Merkus P, Nielsen KG, Oliver C, Oostveen E, Ranganathan S, Ren CL, Robinson PD, Seddon PC, Sly PD, Sockrider MM, Sonnappa S, Stocks J, Subbarao P, Tepper RS, Vilozni D; An official American Thoracic Society workshop report: Optimal lung function tests for monitoring cystic fibrosis, bronchopulmonary dysplasia, and recurrent wheezing in children less than 6 years of age. *Ann Am Thorac Soc.* 2013 Apr;10(2): S1–S11.
- [162] Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Nov 1;186(9):857-65.
- [163] Saglani S, Payne DN, Nicholson A, Scallan M, Haxby E, Bush A. The safety and quality of endobronchial biopsy in children under five years old. *Thorax.* 2003 Dec;58(12):1053-57.

- [164] Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, Jeffery PK. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Nov 1;176(9):858-64.
- [165] Salva PS, Theroux C, Schwartz D. Safety of endobronchial biopsy in 170 children with chronic respiratory symptoms. *Thorax*. 2003 Dec;58(12):1058-60
- [166] Sanders DB, Bittner RC, Rosenfeld M, Redding GJ, Goss CH. Pulmonary exacerbations are associated with subsequent FEV1 decline in both adults and children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2011 Apr;46(4):393-400.
- [167] Scott LK, Toner R. Clinically Promising Biomarkers in Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations. *Lung*. 2017 Aug;195(4):397-401.
- [168] Shoki AH, Mayer-Hamblett N, Wilcox PG, Sin DD, Quon BS. Systematic review of blood biomarkers in cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *Chest*. 2013 Nov;144(5):1659-70.
- [169] Shwachman H., Kulczycki LL. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. *AMA J Dis Child*. 1958 Jul;96(1):6-15.
- [170] Schaedel C, de Monestrol I, Hjelte L, Johannesson M, Kornfält R, Lindblad A, Strandvik B, Wahlgren L, Holmberg L. Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Jun;33(6):483-91.
- [171] Schüler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A, Hug M, Leal T, Lebacq J, Lebecque P, Lenoir G, Stanke F, Wallemacq P, Tümmler B, Knowles MR. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros*. 2004 Aug;3 Suppl 2:151-5.
- [172] Simpson SJ, Ranganathan S, Park J, Turkovic L, Robins-Browne RM, Skoric B, Ramsey KA, Rosenow T, Banton GL, Berry L, Stick SM, Hall GL; AREST CF. Progressive ventilation inhomogeneity in infants with cystic fibrosis after pulmonary infection. *Eur Respir J*. 2015 Dec;46(6):1680-90.
- [173] Singer F, Houlitz B, Latzin P, Robinson P, Gustafsson P. A realistic validation study of a new nitrogen multiple-breath washout system. *PLoS One*. 2012;7(4):e36083.
- [174] Singer F, Yammine S, Schmidt A, Proietti E, Kieninger E, Barben J, Casaulta C, Regamey N, Gustafsson P, Frey U, Latzin P. Ventilatory response to nitrogen multiple-breath washout in infants. *Pediatr Pulmonol*. 2014 Apr;49(4):342-7.



- [175] Sly PD, Tepper R, Henschen M, Gappa M, Stocks J. Tidal forced expirations. ERS/ATS Task Force on Standards for Infant Respiratory Function Testing. European Respiratory Society/American Thoracic Society. *Eur Respir J*. 2000 Oct;16(4):741-8.
- [176] Smyth AR, Rosenfeld M. Prophylactic anti-staphylococcal antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Apr 18;4(4):CD001912.
- [177] Sobonya RE, Taussig LM. Quantitative aspects of lung pathology in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Aug;134(2):290-5.
- [178] Song TW, Kim KW, Kim ES, Park JW, Sohn MH, Kim KE. Utility of impulse oscillometry in young children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008 Dec;19(8):763-8.
- [179] Stafler P, Weinreb S, Mussaffi H, Mei-Zahav M, Prais D, Steuer G, Bar-On O, Hoshen M, Blau H. Feasibility of multiple breath washout measurements in infants with bronchiolitis: A pilot study. *Pediatr Pulmonol*. 2017 Jun;52(6):763-70.
- [180] Stahl M, Graeber SY, Joachim C, Barth S, Ricklefs I, Diekmann G, Kopp MV, Naehrlich L, Mall MA. Three-center feasibility of lung clearance index in infants and preschool children with cystic fibrosis and other lung diseases. *J Cyst Fibros*. 2018 Mar;17(2):249-255.
- [181] Stahl M, Joachim C, Blessing K, Hämmerling S, Sommerburg O, Latzin P, Mall MA. Multiple breath washout is feasible in the clinical setting and detects abnormal lung function in infants and young children with cystic fibrosis. *Respiration*. 2014;87(5):357-63.
- [182] Stocks J, Godfrey S, Beardsmore C, Bar-Yishay E, Castile R. Plethysmographic measurements of lung volume and airway resistance. ERS/ATS Task Force on Standards for Infant Respiratory Function Testing. European Respiratory Society/American Thoracic Society. *Eur Respir J*. 2001 Feb;17(2):302-12.
- [183] Subbarao P, Hulskamp G, Stocks J. Limitations of electronic compensation for measuring plethysmographic airway resistance in infants. *Pediatr Pulmonol*. 2005 Jul;40(1):45-52.
- [184] Subbarao P, Lu Z, Kowalik K, Brown M, Balkovec S, Gustafsson P, Lou W, Ratjen F. Changes in multiple breath washout measures after raised volume rapid thoracoabdominal compression maneuvers in infants. *Pediatr Pulmonol*. 2016 Feb;51(2):183-8.

- [185] Sullivan L, Forno E, Pedersen K, Nielsen JG, Weiner DJ. Nitrogen back-diffusion during multiple-breath washout with 100% oxygen. *Eur Respir J*. 2017 Sep 9;50(3). pii: 1700679.
- [186] Sullivan P, Stephens D, Ansari T, Costello J, Jeffery P. Variation in the measurements of basement membrane thickness and inflammatory cell number in bronchial biopsies. *Eur Respir J*. 1998 Oct;12(4):811-5.
- [187] Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2005 Sep;26(3):458-61.
- [188] Taylor CJ, Hardcastle J, Southern KW. Physiological measurements confirming the diagnosis of cystic fibrosis: the sweat test and measurements of transepithelial potential difference. *Paediatr Respir Rev*. 2009 Dec;10(4):220-6.
- [189] Tepper RS, Morgan WJ, Cota K, Wright A, Taussig LM. Physiologic growth and development of the lung during the first year of life. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Sep;134(3):513-9.
- [190] The raised volume rapid thoracoabdominal compression technique. The Joint American Thoracic Society/European Respiratory Society Working Group on Infant Lung Function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1760-2.
- [191] Thomas MR, Rafferty GF, Limb ES, Peacock JL, Calvert SA, Marlow N, Milner AD, Greenough A. Pulmonary function at follow-up of very preterm infants from the United Kingdom oscillation study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Apr 1;169(7):868-72.
- [192] Tierney DF, Nadel JA. Concurrent measurements of functional residual capacity by three methods. *J Appl Physiol*. 1962 Nov;17:871-3.
- [193] Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Res Pract*. 2018 Dec 21;4:10.
- [194] Tsartsali L, Hislop AA, McKay K, James AL, Elliot J, Zhu J, Rosenthal M, Payne DN, Jeffery PK, Bush A, Saglani S. Development of the bronchial epithelial reticular basement membrane: relationship to epithelial height and age. *Thorax*. 2011 Apr;66(4):280-5.
- [195] Turner DJ, Lanteri CJ, LeSouef PN, Sly PD. Improved detection of abnormal respiratory function using forced expiration from raised lung volume in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 1994 Nov;7(11):1995-9.

- [196] Turner SW, Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Judge PK, Cox M, Young S, Goldblatt J, Landau LI, Le Souëf PN. The relationship between infant airway function, childhood airway responsiveness, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Apr 15;169(8):921-7.
- [197] van der Ent CK, Brackel HJ, van der Laag J, Bogaard JM. Tidal breathing analysis as a measure of airway obstruction in children three years of age and older. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Apr;153(4 Pt 1):1253-8.
- [198] von Ungern-Sternberg BS, Trachsel D, Erb TO, Hammer J. Forced expiratory flows and volumes in intubated and paralyzed infants and children: normative data up to 5 years of age. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Jul;107(1):105-11.
- [199] Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG, Lu A, Yau Y, Tullis E, Ratjen F. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2012 Jul;40(1):61-6.
- [200] Wauer RR, Maurer T, Nowotny T, Schmalisch G. Assessment of functional residual capacity using nitrogen washout and plethysmographic techniques in infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *Intensive Care Med*. 1998 May;24(5):469-75.
- [201] Weibel, ER. *Morphometry of the Human Lung*. New York Academic Press, New York, 1963, ISBN 978-3-642-87553-3.
- [202] Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H, Bentur L, Yahav Y, Springer H, Kramer MR, Klar A, Ilani A, Kerem B, Kerem E. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2001 Jun;17(6):1208-15.
- [203] Young LR, Brody AS, Inge TH, Acton JD, Bokulic RE, Langston C, Deutsch GH. Neuroendocrine cell distribution and frequency distinguish neuroendocrine cell hyperplasia of infancy from other pulmonary disorders. *Chest*. 2011 May;139(5):1060-71.
- [204] Yüksel B, Greenough A. Functional residual capacity to thoracic gas volume (FRC:TGV) ratio in healthy neonates. *Respir Med*. 1995 Jul;89(6):429-33.
- [205] Zapletal A, Šamánek M, Paul T. *Funkce dýchacího ústrojí u dětí a mladistvých*. Osveta, Martin, 1984.

## 11. Seznam zkratek

|                     |   |
|---------------------|---|
| 2. LF UK            | 2. lékařská fakulta University Karlovy  |
| AB                  | asthma bronchiale   |
| ABCA3               | gen pro protein ATP-vázající transportér A3 (ATP-binding cassette transporter A3)   |
| ADAM33              | gen pro protein – disintegrin a metaloproteinázu 33 (A disintegrin and metalloproteinase 33)  |
| API                 | klinický index pro predikci asthma bronchiale (Asthma Predictive Index)   |
| Ar                  | argon   |
| AREST CF            | australský tým pro výzkum respiračního postižení časných stádií cystické fibrózy (Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis) |
| ATB                 | antibiotika   |
| ATS                 | Americká hrudní společnost  |
| BM                  | bazální membrána  |
| BM                  | bazální membrána  |
| BP                  | bodypletysmografie  |
| BPD                 | bronchopulmonální dysplázie   |
| CCDC40              | gen pro coiled-coil doménu obsahující protein 40 (coiled-coiled domain containing protein 40)   |
| CDH                 | vrozená brániční kýla   |
| CF                  | cystická fibróza  |
| CF <sub>malí</sub>  | skupina pacientů s cystickou fibrózou ve věku pod 6 měsíců  |
| CFTR gen            | gen pro regulátor membránové vodivosti u CF (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)   |
| CFTR protein        | transmembránový protein regulující transmembránovou vodivost u CF   |
| CF <sub>velcí</sub> | skupina pacientů s cystickou fibrózou ve věku nad 6 měsíců  |
| CI                  | interval spolehlivosti (confidence interval)  |
| C <sub>L</sub>      | poddajnost plic   |
| CLDI                | chronická plicní nemoc z nezralosti (chronic lung disease of immaturity)  |
| cm                  | centimetr   |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| CO                            | oxid uhelnatý  |
| CO <sub>2</sub>               | oxid hličitý   |
| CR                            | koeficient opakovatelnosti   |
| C <sub>rs</sub>               | poddajnost dýchacího traktu  |
| CSF2RA                        | gen pro $\alpha$ řetězec receptoru pro faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů – GM-CSF              |
| CSF2RB                        | gen pro $\beta$ řetězec receptoru pro faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů                        |
| CT                            | výpočetní tomografie (computerized tomography)   |
| CV                            | koeficient variability   |
| DL <sub>CO</sub>              | difuzní kapacita plic pro oxid uhelnatý  |
| DLPD                          | difuzní onemocnění plicního parenchymu   |
| DNA                           | deoxyribonukleotidová kyselina   |
| DNAH5                         | gen pro těžký dyneinový axonemální řetězec 5 (Dynein Axonemal Heavy Chain 5)                                   |
| DNAI1                         | gen pro intermediální dyneinový axonemální řetězec 1 (Dynein Axonemal Intermediate Chain 1)                    |
| EBB                           | endobronchiální biopsie  |
| ECFS                          | Evropská společnost pro cystickou fibrózu (European Cystic Fibrosis Society)                                   |
| EEV                           | objemová hladina na konci výdechu (end-expiratory volume)  |
| ENaC                          | epiteliální sodíkový kanál (epithelial sodium channel)   |
| ERS                           | Evropská respirační společnost   |
| ERV                           | expirační reziduální objem   |
| etCO <sub>2</sub>             | koncentrace oxidu uhličitýho na konci výdechu (end tidal CO <sub>2</sub> concentration)                        |
| FEF <sub>85/75/50/25/15</sub> | maximální výdechový průtok po vydechnutí 85/75/50/25/15 % vitální kapacity (forced expiratory flow)            |
| FEV <sub>0,5</sub>            | objem usilovně vydechnutého vzduchu během první 0,5 sekundy výdechu (forced expiratory volume in 0,5 second)   |
| FEV <sub>0,75</sub>           | objem usilovně vydechnutého vzduchu během první 0,75 sekundy výdechu (forced expiratory volume in 0,75 second) |
| FEV <sub>1</sub>              | objem usilovně vydechnutého vzduchu během první sekundy výdechu (forced expiratory volume in 1 second)         |

|                    |   |
|--------------------|---|
| FN Motol           | Fakultní nemocnice v Motole   |
| FRC                | funkční reziduální kapacita   |
| FRC <sub>box</sub> | funkční reziduální kapacita stanovená bodypletysmograficky  |
| FRC <sub>dil</sub> | funkční reziduální kapacita stanovená dilučními technikami  |
| FRC <sub>N2</sub>  | funkční reziduální kapacita stanovená z N <sub>2</sub> -MBW (diluční technika)                                |
| FRC <sub>SF6</sub> | funkční reziduální kapacita stanovená z SF <sub>6</sub> -MBW (diluční technika)                               |
| FV křivka          | křivka průtok-objem   |
| FVC                | usilovná vitální kapacita   |
| g                  | gram  |
| GAUK               | Grantová agentura University Karlovy  |
| GM-CSF             | faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů   |
| HRCT               | výpočetní tomografie s vysokým rozlišením (high resolution computerized tomography)                           |
| HRT1               | čas odpovědi na hyperoxii 1 (signifikantní pokles vybraného parametru pod 5. percentil normoxických hodnot)   |
| HRT2               | čas odpovědi na hyperoxii 2 (signifikantní vzestup vybraného parametru nad 5. percentil normoxických hodnot)  |
| HRT3               | čas odpovědi na hyperoxii 3 (signifikantní vzestup vybraného parametru nad 95. percentil normoxických hodnot) |
| HSVM               | vysokorychlostní videomikroskopie   |
| HYDIN              | gen pro protein aparátu centrálního axonemálního páru (axonemal central pair apparatus protein)               |
| chILD              | dětské intersticiální plicní onemocnění (children interstitial lung disease)                                  |
| CHOPN              | chronická obstrukční plicní nemoc   |
| IC                 | inspirační kapacita   |
| IRV                | inspirační reziduální objem   |
| kg                 | kilogram  |
| LCFC               | londýnská skupina pro výzkum cystické fibrózy (London Cystic Fibrosis Colaboration)                           |
| LCI                | očišťovací index plic (lung clearance index)  |
| LCI <sub>2,5</sub> | očišťovací index plic na úrovni 2,5 % původní koncentrace inertního plynu                                     |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| LCI <sub>2,5N<sub>2</sub></sub>   | očišťovací index plic na úrovni 2,5 % původní koncentrace dusíku stanovený pomocí testu N <sub>2</sub> -MBW             |
| LCI <sub>2,5SF<sub>6</sub>2</sub> | očišťovací index plic na úrovni 2,5 % původní koncentrace hexafluoridu síry stanovený pomocí testu SF <sub>6</sub> -MBW |
| LCI <sub>5</sub>                  | očišťovací index plic na úrovni 5 % původní koncentrace inertního plynu   |
| MA <sub>2/3/5</sub>               | klouzavý průměr 2./3./5. řádu (moving average)  |
| MBW                               | test vícedechového vyplavování inertního plynu z plic (multiple breath inert gas washout test)                          |
| MEF <sub>15/25/50/75/85</sub>     | maximální výdechový průtok na úrovni 15/25/50/75/85 % vitální kapacity (maximum expiratory flow)                        |
| MMEF <sub>75-25</sub>             | maximální mid-expirační průtok (průměrný průtok při výdechu z úrovně 75 % FVC na 25 % FVC)                              |
| MR                                | magnetická rezonance  |
| ms                                | milisekunda   |
| mSv                               | milisievert   |
| N <sub>2</sub>                    | dusík   |
| N <sub>2</sub> -MBW               | test vícedechového vyplavování dusíku z plic  |
| NEHI                              | hyperplasie neuroendokrinních buněk kojenců (neuroendocrine cell hyperplasia of infancy)                                |
| nm                                | nanometr  |
| NPD                               | vyšetření rozdílu nosních potenciálů  |
| O <sub>2</sub>                    | kyslík  |
| p.r.                              | per rektum (rektálně)   |
| p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>     | parciální tlak kyslíku v arteriální krvi  |
| PAS                               | barvení pomocí Periodic Acid Schiff Agens   |
| p-hodnota                         | hladina statistické významnosti   |
| PIG                               | plicní intersticiální glykogenóza (pulmonary interstitial glycogenosis)   |
| PsA                               | Pseudomonas aeruginosa  |
| PV křivka                         | křivka tlak-objem   |
| R <sub>aw</sub>                   | odpor dýchacích cest  |
| RBM                               | retikulární bazální membrána  |
| RC                                | metoda měření pasivních mechanických vlastností dýchacího traktu (poddajnosti a odporu) jednouzávěrovou metodou         |

|                      |  |
|----------------------|--|
| RNA                  | ribonukleová kyselina  |
| RR                   | dechová frekvence (respiatory rate)  |
| R <sub>rs</sub>      | odpor dýchacího traktu   |
| RTG                  | rentgenové vyšetření   |
| RV                   | reziduální objem   |
| RV-RTC               | rychlá torakoabdominální komprese zvýšenými objemy (z úrovně celkové plicní kapacity) (raised volume thoracoabdominal compresion)  |
| Sacin                | index nehomogenity vycházející z acinárních dýchacích cest (16. a vyšší generace bronchiálního větvení)  |
| Scond                | index nehomogenity vycházející z konduktivních dýchacích cest (12. – 16. generace bronchiálního větvení)   |
| SF <sub>6</sub>      | hexafluorid síry   |
| SF <sub>6</sub> -MBW | test vícedechového vyplavování hexafluoridu síry z plic  |
| SFTPB                | gen pro surfaktantový protein B (surfactant protein B)   |
| SFTPC                | gen pro surfaktantový protein C (surfactant protein C)   |
| SIDS                 | syndrom náhlého úmrtí kojence  |
| SPAG1                | gen pro jeden z proteinů axonemy řasinky (Sperm Associated Antigen 1)  |
| SpO <sub>2</sub>     | saturace hemoglobinu kyslíkem  |
| StA                  | Staphylococcus aureus  |
| TBB                  | transbronchiální biopsie   |
| tI/tE                | poměr času nádechu ku času výdechu   |
| TLC                  | celková plicní kapacita  |
| tPTEF/tE             | poměr času dosažení maximálního průtoku během výdechu ku celkovému času výdechu  |
| TV-RTC               | rychlá torakoabdominální komprese klidovými objemy (z úrovně klidového nádechu) (tidal volume thoracoabdominal compresion)   |
| TV-RTC               | rychlá torakoabdominální komprese klidovými objemy (z úrovně klidového nádechu) (tidal volume thoracoabdominal compresion)   |
| V <sub>occ</sub>     | objem při okluzi v rámci bodypletysmografického měření (udává rozdíl objemové hladiny na konci nádechu oproti aktuálnímu objemu při uzavěru dýchacích cest, při výpočtu FRC je nutno tento objem vzít v potaz – $FRC = ITGV - V_{occ}$ ) převyšující |
| V'maxFRC             | maximální výdechový průtok na úrovni FRC   |



|                |                                   |
|----------------|-----------------------------------|
| VC             | vitální kapacita                  |
| VE             | minutová ventilace                |
| V <sub>t</sub> | dechový objem                     |
| $\Delta$       | delta (označení pro rozdíl)       |
| $\mu\text{g}$  | mikrogram                         |
| $\mu\text{m}$  | mikrometr                         |
| $\sigma$       | směrodatná odchylka               |
| $\tau_{rs}$    | časová konstanta dýchacího traktu |

## 12. Seznam publikací autora

Publikace se vztahem k dizertační práci:

a) s impact factorem:

- Koucký V, Uhlík J, Hoňková L, Koucký M, Doušová T, Pohunek P. Ventilation Inhomogeneity and Bronchial Basement Membrane Changes in Chronic Neutrophilic Airway Inflammation. *Chest*. 2019 Nov 9;S0012-3692(19)34188-1. [Epub ahead of print]. IF: 9,66.
- Horáček J, Koucký V, Hladík M. Novel approach to computerized breath detection in lung function diagnostics. *Comput Biol Med*. 2018 Oct1;101:1-6. doi: 10.1016/j.combiomed.2018.07.017. Epub 2018 Aug 2. IF: 2,41.
- Koucký V, Skalická V, Pohunek P. Nitrogen multiple breath washout test for infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2018 Aug 2;52(2). pii: 1800015. doi: 10.1183/13993003.00015-2018. Print 2018 Aug. IF: 12,24.

b) bez impact factoru:

- Koucký V., Skalická V., Bartošová J., Doušová T., Vávrová V., Pohunek P. Funkce plic souboru českých kojenců a batolat s cystickou fibrózou. *Čes-slov Pediat* 2019; 74 (7): 392-400.
- Koucký V, Pohunek P. Využití metody vícedechového vyplavování inertního plynu z plic ve funkční plicní diagnostice u dětí. *Stud. Pneumologica et Phthiseologica* 2016; 76 (2):56-66.